

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平 10 - 201481

(43)公開日 平成10年(1998)8月4日

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

1/21

1/21

9/16

9/16

B

C 1 2 P 19/36

C 1 2 P 19/36

// (C 1 2 N 15/09

Z N A

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L

(全 4 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平 9 - 1 6 1 6 7 4

(22)出願日 平成9年(1997)6月18日

(31)優先権主張番号 特願平 8 - 3 1 1 1 0 3

(32)優先日 平 8 (1 9 9 6) 1 1 月 2 1 日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 三原 康博

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素
株式会社中央研究所内

(72)発明者 宇多川 隆

東京都中央区京橋一丁目15-1 味の素株
式会社内

(72)発明者 山田 秀明

京都府京都市左京区松ヶ崎木の本町19-1

(72)発明者 浅野 泰久

富山県射水郡小杉町太閤山9-3-1-321

(54)【発明の名称】ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法

(57)【要約】

【課題】ヌクレオシドを生化学的にリン酸化することにより、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-リン酸エステルを製造する方法を提供する。

【構成】酸性フォスファターゼ、特にヌクレオシドに対する親和性が上昇し及び／又は温度安定性が向上した変異型フォスファターゼならびに該酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を導入した微生物を、pH3.0から5.5の条件下でヌクレオシドならびにポリリン酸(塩)、フェニルリン酸(塩)、カルバミルリン酸(塩)、およびアセチルリン酸(塩)から成る群より選択されるリン酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成せしめ、これを採取する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヌクレオシドに対する親和性が上昇し及び／又は温度安定性の向上した酸性フォスファターゼをpH 3.0～5.5の条件下でヌクレオシドならびに燐酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成せしめ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項2】ヌクレオシドに対する親和性が上昇し及び／又は温度安定性の向上した酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含む組換えDNAによって形質転換された微生物をpH3.0～5.5の条件下でヌクレオシドならびに燐酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成せしめ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項3】酸性フォスファターゼのヌクレオシドに対するKm値が100以下である請求項1又は2記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項4】酸性フォスファターゼが50℃において安定である請求項1又は2記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項5】酸性フォスファターゼがエシェリヒア属細菌、モルガネラ属細菌、プロビデンシア属細菌、エンテロバクター属細菌、クレブジエラ属細菌、又は、セラチア属細菌に由来するものである請求項1又は2記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項6】酸性フォスファターゼが、配列表配列番号4、8、25、27、29又は31に示されるアミノ酸配列と実質的に相同であるアミノ酸配列を含み、かつ、配列表配列番号4、8、25、27、29又は31に示されるアミノ酸配列を含む酸性フォスファターゼのヌクレオシドに対する親和性を上昇させ及び／又は温度安定性を向上させる変異を有する変異型酸性フォスファターゼである請求項5記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項7】前記変異が配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列において63番目のロイシン残基、65番目のアラニン残基、66番目のグルタミン酸残基、69番目のアスパラギン残基、71番目のセリン残基、72番目のセリン残基、74番目のグリシン残基、85番目のセリン残基、92番目のアラニン残基、94番目のアラニン残基、104番目のグルタミン酸残基、116番目のアスパラギン酸残基、130番目のセリン残基、135番目のスレオニン残基、136番目のグルタミン酸残基、151番目のスレオニン残基及び／又は153番目のイソロイシン残基の他のアミノ酸残基への置換である請求項5に記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項8】燐酸供与体がポリ燐酸（塩）、フェニル燐酸（塩）、アセチルリン酸（塩）およびカルバミル燐酸（塩）よりなる群より選択されるものである請求項1又

は2記載のヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法。

【請求項9】配列表配列番号4、8、25、27、29又は31に示されるアミノ酸配列と実質的に相同であるアミノ酸配列を含み、かつ、配列表配列番号4、8、25、27、29又は31に示されるアミノ酸配列を含む酸性フォスファターゼのヌクレオシドに対する親和性を上昇させ及び／又は温度安定性を向上させる変異を有する変異型酸性フォスファターゼ。

【請求項10】前記変異が、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列において63番目のロイシン残基、65番目のアラニン残基、66番目のグルタミン酸残基、69番目のアスパラギン残基、71番目のセリン残基、72番目のセリン残基、74番目のグリシン残基、85番目のセリン残基、92番目のアラニン残基、94番目のアラニン残基、104番目のグルタミン酸残基、116番目のアスパラギン酸残基、130番目のセリン残基、135番目のスレオニン残基、136番目のグルタミン酸残基、151番目のスレオニン残基及び／又は153番目のイソロイシン残基の他のアミノ酸残基への置換である請求項9記載の変異型酸性フォスファターゼ。

【請求項11】請求項9に記載の酸性フォスファターゼをコードする遺伝子

【請求項12】請求項11記載の遺伝子を含む組換えDNA

【請求項13】請求項12に記載された組換えDNAを保有する微生物

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造法に関する。また、本発明は、ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造において有用な新規な酸性フォスファターゼ、該酸性フォスファターゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、該組換えDNAを保有する微生物に関する。ヌクレオシド-5'-燐酸エステルは、調味料、医薬並びにそれらの原料等として有用である。

【0002】

【従来の技術】ヌクレオシドを生化学的に燐酸化してヌクレオシド-5'-燐酸エステルを製造する方法としては、燐酸供与体として、バラニトロフェニル燐酸を用いる方法（特公昭39-29858号）、無機燐酸を用いる方法（特公昭42-1186号）、ポリ燐酸を用いる方法（特開昭53-56390号）、アセチル燐酸を用いる方法（特開昭56-82098号）、アデノシン三燐酸（ATP）を用いる方法（特開昭63-230094号）が知られている。しかしながら、これらの方法にあっては使用する基質が高価であったり、反応副生物が生じたりするために、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-燐酸エステルの生産を行うには満足 of いくものではなかった。

【0003】そこで、本発明者らは、特定の微生物菌体を、酸性条件下でヌクレオシド並びにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されるリン酸供与体に作用させることにより、2'-、3'-ヌクレオチド異性体の副生を伴うことなく、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルを効率よく生成する方法を開発した（特開平7-231793号）。

【0004】しかしながら、この方法においても、使用する微生物菌体にわずかながら存在するヌクレオシド分解活性のために反応中に基質が一部分解され、また、反応を継続すると生成蓄積したヌクレオシド-5'-リン酸エステルが分解するため、反応液中に副生物が生成するとともに、十分な収率が得られなかった。さらに、菌体あたりのリン酸転移活性が低いため、高濃度の基質を添加して反応を行えない等の欠点があった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、安価かつ効率的なヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造方法を提供することである。また、本発明の他の目的は、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造方法において有用な酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA及び該組換えDNAを保有する微生物を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、従来の方
法よりも効率の良いヌクレオシド-5'-リン酸エステルの
製造方法を開発するために種々の検討を加えた結果、
微生物の無細胞抽出液より精製した酸性フォスファター
ゼをpH3.0~5.5の条件下でヌクレオシド並びにポリリン酸
（塩）、フェニルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸（塩）
から成る群より選択されるリン酸供与体に作用させること
により、高収率で効率良くヌクレオシド-5'-リン酸エ
ステルを生産することができることを発見した。さら
に、種々の細菌より酸性フォスファターゼをコードする
野生型遺伝子を取得し、エシェリヒア属細菌に由来する
酸性フォスファターゼに変異を導入することにより、ヌ
クレオシドへのリン酸転移反応においてヌクレオシドへの
親和性が野生型酵素よりも上昇した変異型酸性フォス
ファターゼをコードする遺伝子を取得することに成功し、
遺伝子工学的手法により該遺伝子を大量発現させること
によりヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生産性が飛
躍的に向上することを見いだした。また、本発明者ら
は、本酸性フォスファターゼによるリン酸転移反応をより
高温で行えれば反応速度が向上し、かつ反応液中のリン
酸受容体のヌクレオシド濃度を上げて反応を行えるた
め、さらに効率的にヌクレオシド-5'-リン酸エステルの
製造が可能になると考え、温度安定性が向上した変異
型酸性フォスファターゼの作製を試みた。そして実施例
19に記載の変異型酸性フォスファターゼよりも温度安
定性が向上し、高温条件下で反応が可能な変異型酸性フォ

スファターゼを作製することに成功し、本発明を完成さ
せるに至った。

【0007】すなわち、本発明は、ヌクレオシドへの親
和性が上昇し及び／又は温度安定性が向上した酸性フォ
スファターゼをpH3.0~5.5の条件下でヌクレオシド並び
にリン酸供与体、好ましくはポリリン酸（塩）、フェニルリン
酸（塩）、アセチルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸
（塩）から成る群より選択されるリン酸供与体に作用させ
てヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成せしめ、こ
れを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-リン
酸エステルの製造法を提供するものである。

【0008】また、本発明は、ヌクレオシドに対する親
和性が上昇し及び／又は温度安定性が向上した酸性フォ
スファターゼをコードする遺伝子を含む組換えDNAによ
って形質転換された微生物をpH3.0~5.5の条件下でヌ
クレオシドならびにリン酸供与体、好ましくはポリリン酸
（塩）、フェニルリン酸（塩）、アセチルリン酸（塩）お
よびカルバミルリン酸（塩）から成る群より選択されるリン
酸供与体に作用させてヌクレオチド-5'-リン酸エス
テルを生成せしめ、これを採取することを特徴とするヌク
レオシド-5'-リン酸エステルの製造法を提供するもの
である。

【0009】また、本発明は、ヌクレオシドへの親和性
が上昇し及び／又は温度安定性が向上した変異型酸性フォ
スファターゼ、該酸性フォスファターゼをコードする
遺伝子、該遺伝子を含む組換えDNA、並びに該組換え
DNAを保有する微生物を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

<1>酸性フォスファターゼの取得

本発明において使用される酸性フォスファターゼは、pH
3.0~5.5の条件下で、ヌクレオシドへの、リン酸供与体、
例えば、ポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）、アセチ
ルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸（塩）よりなる群よ
り選択されるリン酸供与体からの、リン酸基の転移によりヌ
クレオシド-5'-リン酸エステルを生成する反応を触媒
するものであれば制限はない。このような酸性ホスファ
ターゼとしては、微生物に由来するものが好ましく、特
に好適な例として、モルガネラ属、エシェリヒア属、プ
ロピデンシア属、エンテロバクター属、クレブシエラ属
又はセラチア属に属する細菌が、当該酵素活性を有して
おり、これら細菌に由来する酵素がある。そのような細
菌の代表例として以下のような菌株を挙げることができ
る。

モルガネラ・モルガニ (Morganella morganii) NCIMB
10466

モルガネラ・モルガニ (Morganella morganii) IF0 3
168

モルガネラ・モルガニ (Morganella morganii) IF0 3
848

エシェリヒア・ブラッタエ (*Escherichia blattae*) JC
M 1650

エシェリヒア・ブラッタエ (*Escherichia blattae*) AT
CC 33429

エシェリヒア・ブラッタエ (*Escherichia blattae*) AT
CC 33430

プロビデンシア・スチュアルティ (*Providencia stuartii*) ATCC 29851

プロビデンシア・スチュアルティ (*Providencia stuartii*) ATCC 33672

エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 12010

エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 13534

クレブシエラ・プランティコラ (*Klebsiella planticola*) IFO 14939

クレブシエラ・プランティコラ (*Klebsiella planticola*) IAM 1133

セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*) IAM 13540

セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*) IAM 12143

【0011】なお、酸性フォスファターゼ (EC 3.1.3.2) は、本来、磷酸エステルを酸性条件下で加水分解する反応を触媒する酵素であり、磷酸転移反応により生成するヌクレオシド-5'-磷酸エステルを分解するヌクレオチダーゼ活性（以下、「磷酸エステル加水分解活性」という）を有している。本発明のヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造法においては、高い収率でヌクレオシドへの磷酸転移反応においてヌクレオシドへの親和性が野生型酵素よりも上昇した変異型酸性フォスファターゼ（以下、単に「変異型酸性フォスファターゼ」ともいう）を使用する。好ましくはヌクレオシドに対する K_m 値が100以下の変異型酸性フォスファターゼを使用する。

【0012】変異型酸性フォスファターゼは、後述するように、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を直接変異させることによって得られる変異型遺伝子を発現させることによって得られるが、ヌクレオシドへの親和性が上昇した酸性フォスファターゼを産生する微生物を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の通常人工突然変異に用いられている変異剤により処理し、ヌクレオシドへの親和性が上昇した変異型酸性フォスファターゼを産生するようになった微生物を培養することによっても、変異型酸性フォスファターゼを得ることができる。

【0013】上記のような微生物から酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質を得るには、該活性を有する菌株を適当な培地で培養し、増殖した菌体を回収し、当該菌体を破碎して無細胞抽出液を調製して、これより必要

に応じ精製すればよい。

【0014】微生物を培養する培地には格別の制限はなく、通常の炭素源、窒素源、無機イオン及び必要ならば有機栄養源を含む通常の培地でよい。炭素源としては、グルコース、シュクロース等の糖類、グリセロール等のアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、磷酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオンその他が必要に応じ適宜使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸等、又はこれらを含有する酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステイープリカー、カゼイン分解物、大豆加水分解物等が適宜用いられる。

【0015】培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好氣的条件下にてpH5~8及び温度25~40°Cの範囲内でpH及び温度を適当に制御しつつ12~48時間程度培養を行えばよい。

【0016】増殖した菌体は、遠心分離等により培養液から回収することができる。回収した菌体から無細胞抽出液を調製するには、通常の方法が用いられる。すなわち、菌体を超音波処理、ダイノミル、フレンチプレス等の方法にて破碎し、遠心分離により菌体残渣を除去することにより無細胞抽出液が得られる。

【0017】無細胞抽出液から酸性フォスファターゼを精製するには、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、等電点沈殿等、酵素の精製に通常用いられる手法が適宜組み合わせ用いられる。精製は、完全精製である必要は必ずしもなく、基質のヌクレオシドの分解に関与する酵素等の夾雑物が除去できればよい。

【0018】＜2＞酸性フォスファターゼ遺伝子の取得
酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片は、当該酵素活性を有する微生物等の細胞からクローニングすることができる。クローニング方法としては、例えば、酵素活性を指標として染色体遺伝子発現ライブラリーを探索する方法、当該蛋白質に対する抗体を作成して染色体遺伝子発現ライブラリーを探索する方法、精製された蛋白質のN末端等のアミノ酸配列を解析し、これを基にプローブを作製し遺伝子ライブラリーを探索する方法等がある。

【0019】具体的には、上記のモルガネラ・モルガニ、エシェリヒア・ブラッタエ、プロビデンシア・スチュアルティ、エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・プランティコラ、セラチア・フィカリア、又はセラチア・マルセセンスの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子は、それぞれの微生物の染色体遺伝子発現ライブラリーを作成し、フォスファターゼ活性を指標として該ライブラリーを探索することによりクローニン

グできる。

【0020】すなわち、まず、上記細菌より染色体DNAを調製し、これを適当な制限酵素で部分分解した後、エシェリヒア・コリで自律複製できるベクターに連結し、得られた組換えDNAを用いてエシェリヒア・コリを形質転換することにより染色体遺伝子発現ライブラリーが作成できる。染色体DNAを切断する際に、切断反応時間等を調節して切断の程度を調整すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。また、遺伝子のクローニングに使用するベクターとしては、エシェリヒア・コリで自律複製できるベクターであればいかなるものでも構わない。例えば、pUC19、pUC118、pHSG298、pBR322、pBluescriptII等が用いられる。

【0021】ベクターと、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を連結して組換え体DNAを調製するには、染色体DNAを切断するときに用いる制限酵素と同じもの、又は染色体DNA断片の切断面に相補する切断面を生じる制限酵素を用いてあらかじめベクターを切断し、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いてDNA断片との連結を行えばよい。作成した組換えDNAの受容菌としては、ベクターの複製に好適なものであればいずれの菌株でもよく、例えばHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が用いられる。

【0022】かくして得られる形質転換体を寒天培地上に生育させコロニーを形成させた後、培地表面にp-ニトロフェニル燐酸を含む反応液を注ぎ反応を行うと、フォスファターゼ活性を発現した株は、p-ニトロフェノールを遊離して黄色を示す。前記反応を酸性条件下で行い、呈色を指標として形質転換体を選択することにより、目的の酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を保有する形質転換体を選択することができる。

【0023】次いで、選択された形質転換体より組換えDNAを回収し、ベクターに連結されている酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の構造を解析する。酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の塩基配列は、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の遺伝子の場合、配列表配列番号2に、エシェリヒア・ブラッカエ JCM 1650由来の遺伝子の場合、配列表配列番号6に、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851由来の遺伝子の場合、配列表配列番号21に、エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来の遺伝子の場合、配列表配列番号23に、クレブシエラ・プランティコラ IF0 14939由来の遺伝子の場合、配列表配列番号25に、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の遺伝子の場合、配列表配列番号27にそれぞれ示される。

【0024】上記遺伝子によりコードされると推定される酸性ホスファターゼのアミノ酸配列を、配列表配列番号4、8、22、24、26又は28に示す。上記の遺伝子によってコードされる酸性ホスファターゼは、本発

明に好適に使用することができる。さらに、上記遺伝子によってコードされる酸性ホスファターゼのアミノ酸配列のいずれかと実質的に相同であるアミノ酸配列を有する酸性ホスファターゼも、本発明に好適に使用することができる。「実質的に相同」とは、酸性ホスファターゼのアミノ酸配列が、ヌクレオシド-5'-燐酸エステル生成活性（以下、「燐酸転移活性」という）を失わないような1又は2以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転移を含んでいてもよいことを意味する。

【0025】<3>変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の取得

上記で得られる野生型酸性フォスファターゼは、燐酸エステル加水分解活性を有するため、ヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造においては、反応時間の経過とともに生産物の分解を伴い、反応収率を低下させる要因となることがある。これを避けるためには、ヌクレオシドに対する親和性が上昇するように酸性フォスファターゼをコードする遺伝子に人為的に変異を起こさせればよい。また、本酸性フォスファターゼによる燐酸転移反応をより高温で行えれば反応速度が向上し、かつ反応液中のリン酸受容体のヌクレオシド濃度を上げて反応を行えるため、さらに効率的にヌクレオシド-5'-燐酸エステルの製造が可能となる。このためには、温度安定性が向上するように酸性フォスファターゼをコードする遺伝子に人為的に変異を起こさせればよい。

【0026】DNAの目的部位に目的の変異を起こす部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989)) ; Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987))、ファージを用いる方法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) などがある。

【0027】ヌクレオシドに対する親和性が上昇した変異型酸性フォスファターゼの例としては、配列表配列番号4、8、22、24、26又は28に示されるアミノ酸配列と実質的に相同であるアミノ酸配列を含み、かつ、野生型酸性フォスファターゼのヌクレオシドに対する親和性を上昇させる変異を有する変異型酸性フォスファターゼが挙げられる。具体的には、エシェリヒア・ブラッカエ JCM 1650由来の酵素の場合、配列表配列番号8に示されるアミノ酸配列において74番目のグリシン残基及び/又は153番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換したものが挙げられる。後述の実施例では、74番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に、153番目のイソロイシン残基をスレオニン残基に置換した変異型酸性フォスファターゼ遺伝子取得の例を示した。

【0028】配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列において63番目のロイシン残基、65番目のアラニ

ン残基、66番目のグルタミン酸残基、69番目のアスパラギン残基、71番目のセリン残基、72番目のセリン残基、85番目のセリン残基、92番目のアラニン残基、94番目のアラニン残基、116番目のアスパラギン酸残基、130番目のセリン残基、135番目のスレオニン残基、及び／又は136番目のグルタミン酸残基の他のアミノ酸残基への置換が生じると、さらに酸性フォスファターゼのヌクレオシドに対する親和性が上昇する。温度安定性が向上した変異型酸性フォスファターゼの例としては、配列表配列番号4、8、22、24、26又は28に示されるアミノ酸配列と実質的に相同であるアミノ酸配列を含み、かつ、野生型酸性フォスファターゼの温度安定性を向上させる変異を有する変異型酸性フォスファターゼが挙げられる。具体的には、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650由来の酵素の場合、配列表配列番号8に示されるアミノ酸配列において104番目のグルタミン酸残基及び／又は151番目のスレオニン残基が他のアミノ酸残基に置換したものが挙げられる。後述の実施例では、104番目のグルタミン酸残基をグリシン残基に置換したものおよび、151番目のスレオニン残基をアラニン残基に置換した変異型酸性フォスファターゼ遺伝子取得の例を示した。

【0029】従って、これらの変異型酸性フォスファターゼをコードするように、上記の部位特異的変異法により、野生型遺伝子の特定の部位において塩基の置換を行えばよい。なお、ヌクレオシドに対する親和性を上昇させる変異は、野生型酸性フォスファターゼと比較してヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生成活性の実質的な低下を伴わない変異であることが望ましく、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生成活性が低下する場合であっても、リン酸エステル加水分解活性の方が低下の程度が大きく、その結果、リン酸エステル加水分解活性／ヌクレオシド-5'-リン酸生成活性の比が野生型酸性フォスファターゼより低くなるような変異であればよい。ヌクレオシドに対する親和性上昇の程度としては、ヌクレオシドへのリン酸転移反応においてヌクレオシドに対する K_m 値が100以下となることが好ましい。また、温度安定性の向上した変異とは、同一の条件での温度で処理した後に残存する活性が、野生型酸性フォスファターゼよりも高くなっているものをいう。温度安定性の向上の程度としてはpH7.0、50℃で30分処理しても活性の低下が起らない程度に安定性が向上したものが望ましい。

【0030】後述の実施例のように、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650の酸性フォスファターゼのアミノ酸配列は、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の酸性フォスファターゼと高い相同性を有しており、配列番号4に示されるアミノ酸配列において72番目のグリシン残基、102番目のグルタミン酸残基、149番目のスレオニン残基及び151番目のイソロイシン残基は、それぞれ配列番号8に示されるアミノ酸配列における74番

目のグリシン残基、104番目のグルタミン酸残基、151番目のスレオニン残基及び153番目のイソロイシン残基に相当する。また、エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650以外にも、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851、エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010、クレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939及びセラチア・フィカリア IAM 13540等の微生物に由来する酸性フォスファターゼのアミノ酸配列も、モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の酸性フォスファターゼと相同性が高く、それぞれ配列番号4に示されるアミノ酸配列において72番目のグリシン残基、102番目のグルタミン酸残基、149番目のスレオニン残基及び151番目のイソロイシン残基に相当するアミノ酸残基を有しており、同様にして変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を得ることができる。配列番号4に示されるアミノ酸配列における72番目のグリシン残基、102番目のグルタミン酸残基、149番目のスレオニン残基及び151番目のイソロイシン残基に相当するアミノ酸残基は、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851、エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010及びクレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939由来の酸性ホスファターゼでは、配列表配列番号22、24及び26に示すアミノ酸配列において、92番目のグリシン残基、122番目のグルタミン酸残基、169番目のスレオニン残基及び171番目のイソロイシン残基であり、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の酸性ホスファターゼでは、配列表配列番号28に示すアミノ酸配列において、88番目のグリシン残基、118番目のグルタミン酸残基、165番目のスレオニン残基及び167番目のイソロイシン残基である。

【0031】上記各酸性フォスファターゼのアミノ酸配列を比較した結果は図12に示されている。図12に基づいて、一つの酸性フォスファターゼのある位置のアミノ酸残基が、別の酸性フォスファターゼではどの位置のアミノ酸残基に相当するのかを判断することができる。

【0032】＜4＞酸性フォスファターゼ遺伝子の宿主への導入

上記のようにして得られる酸性フォスファターゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片は、適当なベクターに再度組換えて宿主細胞に導入させることにより、酸性フォスファターゼ活性を高レベルに発現した組換え菌を得ることができる。その際、野生型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を用いれば、野生型酸性ホスファターゼが、変異型酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を用いれば、変異型酸性ホスファターゼが発現される。

【0033】宿主としては、上記したHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が挙げられるが、これ以外にも、構築した組換えDNAの複製起点と酸性フォスファターゼ遺伝子が機能し、組換えDNAが複製可能で

かつ酸性フォスファターゼ遺伝子の発現が可能な細菌ならば、すべて宿主として利用できる。最も好ましい宿主の1つはエシェリヒア・コリ JM109である。

【0034】酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を組み込むベクターとしては、宿主において複製可能なものであれば特に制限はない。宿主としてエシェリヒア・コリを用いる場合には当該細菌で自律複製できるプラスミドを挙げるができる。例えば、ColE1系プラスミド、p15A系プラスミド、R因子系プラスミド、ファージ系プラスミド等を用いることができる。具体的に例示すれば、pBR322 (Gene, 2, 95 (1977))、pUC19 (Gene, 33, 103 (1985))、pUC119 (Methods in Enzymology, 153, 3 (1987))、pACYC184 (J. Bacteriol, 134, 1141 (1978))、pSC101 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 70, 3240 (1973)) 等が挙げられる。

【0035】酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が、宿主で機能可能なプロモーターを含んでいる場合には、そのままベクターに連結すればよい。前記DNA断片がプロモーターを含まない場合には、前記遺伝子の upstream に、lac、trp、PL等の宿主微生物内で働く他のプロモーターを連結すればよい。前記DNA断片がプロモーターを含んでいる場合であっても、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を効率的に発現させるために、他のプロモーターと置換してもよい。

【0036】酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとを連結させてなる組換えDNAを宿主に導入する方法としては特に制限はなく、通常の方法により行うことができる。宿主としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、塩化カルシウム法 (J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))、Hanahan法 (J. Mol. Biol., 166, 557 (1983))、SEM法 (Gene, 96, 23 (1990))、Chungらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 2172 (1989))、電気穿孔法 (Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)) などの方法を用いることができる。

【0037】また、上記のように、酸性フォスファターゼ遺伝子を自律複製可能なベクターDNAに挿入したものを宿主に導入し、染色体外DNAとして宿主に保持させてもよいが、酸性フォスファターゼ遺伝子を、トランスダクション、トランスポゾン (Biotechnol., 1, 417 (1983))、Muファージ (特開平2-109985) または相同組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主微生物の染色体に組み込んでもよい。

【0038】<5>組換え菌による酸性フォスファターゼ遺伝子の発現

上記のようにして得られる酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含む組換えDNAを導入した形質転換体は、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要ならば有機

栄養源を含む適当な培地で培養することにより酸性フォスファターゼ活性を高レベルで菌体内に発現することができる。炭素源としては、グルコース等の炭水化物、グリセロール等のアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、燐酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、その他が必要に応じ適宜使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸等及びこれらを含有する酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステイープリカー、カゼイン分解物、大豆加水分解物、その他が適宜用いられる。また、培地にIPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) 等の、プロモーターに応じた発現誘導剤を添加することにより、酸性フォスファターゼ活性の発現量が上昇する場合がある。

【0039】培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好気的条件下にてpH5~8及び温度25~40℃の範囲内でpH及び温度を適当に制御しつつ12~48時間程度培養を行なえばよい。

【0040】次いで、培養物から菌体を回収し、破碎により無細胞抽出液を取得し、これから酸性フォスファターゼを精製することができる。精製には上記<1>に述べたような酵素の精製に通常用いられる手法が適宜組み合わせ用いられる。精製は完全精製である必要は必ずしもなく、基質のヌクレオシドの分解に関与する酵素等の夾雑物が除去できればよい。

【0041】<6>ヌクレオシド-5'-燐酸エステル

の製造
上記<1>で取得した酸性フォスファターゼ又は上記<5>に示したような遺伝子工学的的手法により遺伝子を大量発現させて得られる酸性フォスファターゼをヌクレオシド並びに燐酸供与体、好ましくはポリ燐酸 (塩)、フェニル燐酸 (塩)、アセチルリン酸 (塩) 及びカルバミル燐酸 (塩) よりなる群より選択された燐酸供与体に接触反応させることにより、反応液中にヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成することができる。この際、高い生産性を得るには、反応液のpHを3.0~5.5の範囲の弱酸性に調製することが重要である。

【0042】また、遺伝子工学的的手法により酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を大量発現させた場合、特に、ヌクレオシドに対する親和性が上昇した変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を大量発現させた場合には、精製した酸性フォスファターゼに替えて、形質転換体の菌体を含む培養物、該培養物から分離・回収した菌体、該菌体を固定化处理、アセトン処理、凍結乾燥処理等した菌体処理物を使用することによっても、安価かつ効率的にヌクレオシド-5'-燐酸エステルを生成することができる。

【0043】使用するヌクレオシドとしては、プリンヌ

10

20

30

40

50

クレオシド類として、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサントシン、プリンリボシド、6-メトキシプリンリボシド、2, 6-ジアミノプリンリボシド、6-フルオロプリンリボシド、6-チオプリンリボシド、2-アミノ-6-チオプリンリボシド、メルカプトグアノシン等、ピリミジンヌクレオシド類として、ウリジン、シチジン、5-アミノウリジン、5-ヒドロキシウリジン、5-プロモウリジン、6-アザウリジン等が挙げられる。反応によりこれらの天然型ヌクレオシド及び非天然型ヌクレオシドの5'位が特異的にリン酸化され、それ

【0044】反応液に添加するヌクレオシドの濃度は1~20g/dlが望ましい。水に難溶性のヌクレオシドを使用する場合には、界面活性剤を添加すると反応収率が向上する場合がある。ヌクレオシドが発酵法により製造される場合には、発酵終了後の発酵液をそのままリン酸化反応液に添加することができる。発酵液にヌクレオシド-5'-リン酸エステルを分解する成分が含まれる場合には、これら成分を除去する程度の精製操作を行うことが好ましい。

【0045】リン酸供与体として用いられるポリリン酸(塩)としては、ピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸もしくはそれらの混合物、又はそれらのナトリウム塩、カリウム塩もしくはそれらの塩混合物などが、フェニルリン酸(塩)としては、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O, O-ジフェニルリン酸無水物もしくはそれらの混合物などが、カルバミルリン酸(塩)としては、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウムもしくはそれらの混合物などが、アセチルリン酸(塩)としては、アセチルリン酸リチウムカリウムなどが使用可能である。リン酸供与体の使用濃度は、リン酸受容体であるヌクレオシドの濃度によって決定される。通常、ヌクレオシドの1~5倍量が望ましい。

【0046】反応は通常、温度20~60°C、好ましくは30~40°Cで、pH3.5~6.5、好ましくはpH4.0~5.0の弱酸性側が好結果を与える。温度安定性が向上した変異型酸性フォスファターゼで反応を行う場合には、反応温度は20~70°C、好ましくは30~60°Cである。反応には静置又は攪はんのいずれの方法も採用し得る。反応時間は、使用する酵素の活性、基質濃度などの条件によって異なるが、1~100時間である。

【0047】このようにして生成したヌクレオシド-5'-リン酸エステルを反応終了混合物より採取分離するには、合成吸着樹脂を用いる方法や沈殿剤を用いる方法、その他通常の採取分離方法が採用できる。

【0048】

【実施例】以下、実施例にて本発明を具体的に説明する

が、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0049】リン酸転移活性の測定は、イノシンを基質として次の条件で行った。イノシン40μmol/ml、ピロリン酸ナトリウム100μmol/ml、酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)100μmol/ml及び酵素を含む反応液(1ml)でpH5.0、30°Cで10分反応を行った。2N塩酸200μlを添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除去し、リン酸転移反応により生成した5'-イノシン酸を定量した。この標準反応条件にて1分間に1μmolの5'-イノシン酸を生成する酵素量を1 unitと定めた。

【0050】また、リン酸エステル加水分解活性の測定は、5'-イノシン酸を基質として次の条件で行った。5'-イノシン酸10μmol/ml、メス/NaOH緩衝液(pH6.0)100μmol/ml及び酵素を含む反応液(1ml)で30°Cで10分反応を行った。2N塩酸200μlを添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除去し、加水分解反応により生成したイノシンを定量した。この標準反応条件にて1分間に1μmolのイノシンを生成する酵素量を1 unitと定めた。

【0051】なお、イノシン及び5'-イノシン酸は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、下記の条件にて分析した。

カラム: Cosmosil 5C18-AR (4.6×150mm) [ナカライテスク社製品]

移動相: 5mM リン酸カリウムバッファー(pH 2.8) / メタノール = 95/5

流速: 1.0 ml/min

温度: 室温

検出: UV 245 nm

【0052】また、イノシン以外のヌクレオシドを原料とするヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生成反応においても、原料のヌクレオシド及び生成したヌクレオシド-5'-リン酸エステルは、上記と同様にHPLCにより分析した。

【0053】実施例1 モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼの精製と性質

ペプトン1g/dl、酵母エキス0.5g/dl及び食塩1g/dlを含有する栄養培地(pH7.0)50mlを500ml坂口フラスコに入れ、120°Cにて20分間加熱殺菌した。これに、斜面培養したモルガネラ・モルガニ NCIMB 10466を一白金耳接種し、30°Cで16時間振盪培養した。培養液から遠心分離により回収した菌体約3,000gを1Lの100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0)に懸濁し、4°Cで20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除去し、無細胞抽出液を調製した。

【0054】この無細胞抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離により生成した沈澱を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈澱を遠心分離で集め、100mMリン酸カリウムバッファーに溶解した。

【0055】この粗酵素液を100mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0) 5 Lに対し4回透析した後、20mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0) で平衡化したDEAE-トヨパール 650Mカラム (φ4.1×22cm) にチャージし、800mlの20mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0) で洗浄した。磷酸転移活性は、素通り画分にあったので、当該画分を回収した。

【0056】この活性画分に、35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、35%硫酸飽和の20mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0) で平衡化したブチルトヨパールカラム (φ3.1×26cm) に吸着させた。35%飽和から20%飽和磷酸カリウムバッファ (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。

【0057】活性画分を集め、50mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0) 1 Lに対し透析した後、50mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0) で平衡化したヒドロキシアパタ *

工程	総活性 (unit)	総蛋白 (mg)	比活性 (unit/mg)	回収率 (%)
1. 無細胞抽出液	597	127,200	0.005	100
2. 硫酸分画 (30 ~ 60 %)	568	122,210	0.005	95
3. DEAE-トヨパール	517	36,498	0.014	87
4. ブチルトヨパール	394	1,121	0.351	66
5. ヒドロキシアパタイト	112	50	2.244	19
6. Superdex200	63	24	2.630	10

【0061】精製された酵素は次の性質を有していた。

(1) 作用：ポリ磷酸等の磷酸供与体よりヌクレオシドに磷酸を転移し、ヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成する。逆に磷酸エステルを加水分解する作用も示す。

(2) 基質特異性：磷酸転移反応においてはピロ磷酸、トリポリ磷酸、トリメタ磷酸、テトラメタ磷酸、ヘキサメタ磷酸、フェニル磷酸ジナトリウム、フェニル磷酸ジカリウム、O, O-ジフェニル酸無水物、カルバミル磷酸ジナトリウム、カルバミル磷酸ジカリウム、カルバミル磷酸ジアンモニウム、カルバミル磷酸ジリチウムなどが磷酸供与体となる。また、磷酸受容体としてはプリンリボシド、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサントシン、ウリジン、シチジン等が磷酸受容体となる。一方、磷酸エステル加水分解反応においては、ピロ磷酸、トリポリ磷酸、トリメタ磷酸、テトラメタ磷酸、ヘキサメタ磷酸等の無機磷酸、また、フェニル磷酸ジナトリウム、フェニル磷酸ジカリウム、O, O-ジフェニル磷酸無水物、カルバミル磷酸ジナトリウム、カルバミル磷酸ジカリウム、カルバミル磷酸ジアンモニウム、カルバミル磷酸ジリチウム等の磷酸エステル、さらに、5'-プリンリボチド、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-アデニル酸、5'-キサンチル酸、5'-ウリジル酸、5'-シチジル酸等の5'-ヌクレオチドが作用を受ける。

(3) 至適pH：5.2 (磷酸転移反応)、6.5 (磷酸エステル加水分解反応)

*イトカラム (φ5×6.5cm) に吸着させた。50mMから300mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。

【0058】活性画分を集め、限外ろ過により濃縮した。この酵素液をHiLoad TM 16/60 Superdex200カラム (ファルマシア社製品) に注入し、100mM食塩を含む50mM磷酸カリウムバッファ (pH7.0)、流速1.0ml/分にて溶出した。

【0059】以上の操作によって、磷酸転移活性を示す酵素を無細胞抽出液より最終的に約10%の回収率で約550倍に精製した。この精製過程における比活性及び回収率を表1に示す。この酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

【0060】

【表1】

(4) pH安定性：pH3.0~12.0 (30℃、60分処理)

(5) 至適温度：35℃付近

(6) 温度安定性：30℃まで安定 (pH7.0、30分処理)

(7) 金属イオン及び阻害剤の影響：本酵素活性は金属イオン添加による活性化現象は見られず、Ag²⁺、Pb²⁺、Hg²⁺及びCu²⁺によって阻害される。また、ヨード酢酸によって阻害される。

(8) 分子量：高速液体クロマトグラフィー (TSKgel G-3000SW、東ソー社製品)により約190,000と算出される。

(9) サブユニット分子量：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約25,000と算出される。

【0062】本酵素はヌクレオシドへの磷酸転移活性だけでなく、逆に磷酸エステルを加水分解する活性も示し、しかも磷酸エステル分解活性のほうが磷酸転移活性に比べて20倍以上高い活性を示した。また、その他の性質もモルガネラ属の菌が産生する既知の酸性フォスファターゼとよく一致することから (Microbiology, 140, 1341-1350 (1994))、本酵素は酸性フォスファターゼであることが明らかとなった。

【0063】ピロ磷酸ナトリウム10g/dl及びイノシン2g/dlをpH5.5、5.0、4.5、4.0、3.5の各pHの酢酸ナトリウムバッファに溶解し、これに上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加した。各pHを維持しながら30℃で6時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は、5'-イノシン酸のみで、2'-イノシン酸及び3'-イノ

シノ酸の副生は全く認められなかった。結果を図1に示す。5'-イノシン酸の生成速度はpH5.0の時に最大となったが、5'-イノシン酸の最大蓄積量はpHがより低い方が高くなった。5'-イノシン酸の生産にはpH4.0の反応条件が最も効率がよく、3時間の反応で2.60g/dlの5'-イノシン酸が生成蓄積した。

【0064】実施例2 モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ標品による種々のヌクレオシドの磷酸化反応

ピロ磷酸ナトリウム10g/dl及び磷酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジンを2g/dlを酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに実施例1の酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、30℃で3時間反応させた。反応により生成したヌクレオシド-5'-エステルの量を表2に示す。

【0065】なお、生成したヌクレオシドはヌクレオシド-5'-エステルのみでヌクレオシド-2'-エステル及びヌクレオシド-3'-エステルの副生は全く認められなかった。

【0066】

【表2】

磷酸供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dl)
トリポリ磷酸ナトリウム	2.10
ポリ磷酸ナトリウム	2.72
フェニル磷酸ジナトリウム	2.33
カルバミル磷酸ジナトリウム	2.54

【0070】実施例4 エシェリヒア・ブラッタエ由来の酸性フォスファターゼの精製と性質

ペプトン1g/dl、酵母エキス0.5g/dl及び食塩1g/dlを含有する栄養培地 (pH7.0) 50mlを500ml坂口フラスコに入れ、120℃にて20分間加熱殺菌した。これに、斜面培養したエシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650を一金耳接種し、30℃で16時間振盪培養した。培養液から遠心分離により菌体を回収した。この菌体約3,300gを1Lの100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0071】この無細胞抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離により生成した沈澱を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈澱を遠心分離により回収し、100mM磷酸カリウムバッファーに溶解した。

【0072】この粗酵素液を100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) 5Lに対し4回透析した後、20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラム (φ6.2×35cm) にチャージし、20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で洗浄した。磷酸転移活性は素通り画分にあったので、当該画分を回収した。

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	2.60
グアノシン	5'-グアノシン酸	1.90
ウリジン	5'-ウリジン酸	1.30
シチジン	5'-シチジン酸	0.98

【0067】実施例3 モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ標品による種々の磷酸化合物を磷酸供与体とする5'-イノシン酸の生産

イノシン2g/dl及び磷酸供与体としてトリポリ磷酸ナトリウム、ポリ磷酸ナトリウム (商品名: ポリゴンP、千代田化学 (株) 製品)、フェニル磷酸ジナトリウム又はカルバミル磷酸ジナトリウム10g/dlを酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに実施例1で調製した酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら30℃で3時間反応させた。反応により生成した5'-イノシン酸の量を表3に示す。

【0068】いずれの磷酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ磷酸ナトリウムを磷酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0069】

【表3】

【0073】この活性画分に35%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、これを35%飽和硫酸アンモニウムを含む20mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したブチルトヨパールカラム (φ5.0×22.5cm) に吸着させた。これを35%飽和から20%飽和磷酸カリウムバッファー (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。

【0074】活性画分を集め、100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) 1Lに対し透析した後、100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (φ3.0×7.0cm) に吸着させた。これを50mMから100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) の直線的な濃度勾配で溶出し、活性画分を集めた。

【0075】この酵素液を10mM磷酸カリウムバッファー (pH6.0) 1Lに対し透析した後、10mM磷酸カリウムバッファー (pH6.0) で平衡化したCM-Toyopearlカラム (φ2.0×14.0cm) に吸着させた。これを0mMから300mM塩化カリウムを含む磷酸カリウムバッファー (pH6.0) の直線的な濃度勾配で溶出した。この活性画分を集めた。

【0076】以上の操作によって、磷酸転移活性を示す酵素を無細胞抽出液より最終的に約16%の回収率で約600倍に精製した。この精製過程における比活性及び回収率を表4に示す。この酵素標品は、SDS-ポリアクリ

ルアミド電気泳動において均一であった。

【0077】

*【表4】

*

工程	総活性 (unit)	総蛋白 (mg)	比活性 (unit/mg)	回収率 (%)
1. 無細胞抽出液	363	160,630	0.002	100
2. 硫酸分画 (30 ~ 60 %)	340	138,893	0.002	93
3. DEAE-トヨパール	318	30,440	0.010	87
4. フタルトヨパール	232	661	0.347	63
5. ヒドロキシアパタイト	96	96	1.000	26
6. CM-Toyoparl	59	43	1.365	16

【0078】精製された酵素は次の性質を有していた。

(1) 作用：ポリリン酸等のリン酸供与体よりヌクレオシドにリン酸を転移し、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する。逆にリン酸エステルを加水分解する作用も示す。

(2) 基質特異性：リン酸転移反応においてはピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O、O-ジフェニルリン酸無水物、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウムなどがリン酸供与体となる。またリン酸受容体としてはプリンリボシド、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサンチン、ウリジン、シチジン等がリン酸受容体となる。一方、リン酸エステル加水分解反応においては、ピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸等の無機リン酸、また、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O、O-ジフェニルリン酸無水物、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウム等のリン酸エステル、そして5'-プリンリボチド、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-アデニル酸、5'-キサンチル酸、5'-ウリジル酸、5'-シチジル酸等の5'-ヌクレオチドが作用を受ける。

(3) 至適pH：5.2（リン酸転移反応）、6.5（リン酸エステル加水分解反応）

(4) pH安定性：pH3.5~12.0（30℃、60分処理）

(5) 至適温度：35℃付近

(6) 温度安定性：40℃まで安定（pH7.0、30分処理）

(7) 金属イオン及び阻害剤の影響：本酵素活性は金属イオン添加による活性化現象は見られず、Fe²⁺、Ag²⁺、Pb²⁺、Hg²⁺及びCu²⁺によって阻害される。また、ヨード酢酸によって阻害される。

(8) 分子量：高速液体クロマトグラフィー（TSKgel G-3000SW、東ソー社製品）により約188,000と算出される。

(9) サブユニット分子量：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約24,500と算出される。

【0079】本酵素もモルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の無細胞抽出液より精製した酵素と同様にヌクレオシドへのリン酸転移活性だけでなく、逆にリン酸エステルを加

水分解する活性も示した。しかもリン酸エステル分解活性のほうがリン酸転移活性に比べて30倍以上高い活性を示すことから、酸性フォスファターゼであることが明らかとなった。

【0080】ピロリン酸ナトリウム15g/dl及びイノシン3g/dlをpH5.5、5.0、4.5、4.0、3.5の各pHの酢酸ナトリウムバッファーに溶解し、これに上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加した。各pHを維持しながら30℃で6時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5'-イノシン酸のみで、2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図2に示す。5'-イノシン酸の生成速度はpH5.0の時に最大となったが、5'-イノシン酸の最大蓄積量はpHがより低い範囲の方が高く、5'-イノシン酸の生産はpH4.0の反応条件が最も効率的であった。30℃、pH4.0の反応では3時間で1.56g/dlの5'-イノシン酸が生成蓄積した。

【0081】実施例5 エシェリヒア・ブラッタエ由来の酸性フォスファターゼ標品による種々のヌクレオシドのリン酸化反応

ピロリン酸ナトリウム15g/dl及びイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジンを3g/dlを酢酸ナトリウムバッファー（pH4.0）に溶解し、これに実施例4の酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で3時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-エステルの量を表5に示す。

【0082】なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-エステルのみでヌクレオシド-2'-エステル及びヌクレオシド-3'-エステルの副生は全く認められなかった。

【0083】

【表5】

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	1.56
グアニシン	5'-グアニル酸	1.05
ウリジン	5'-ウリジル酸	1.87
シチジン	5'-シチジル酸	1.22

【0084】実施例6 エシェリヒア・ブラッタエ由来の酸性フォスファターゼ標品による種々のリン酸化合物をリン酸供与体とする5'-イノシン酸の生産
イノシン2g/dl及びリン酸供与体としてトリポリリン酸ナト

リウム、ポリリン酸ナトリウム（商品名：ポリゴンP、千代田化学（株）製品）、フェニルリン酸ジナトリウム又はカルバミルリン酸ジナトリウム10g/dlを酢酸ナトリウムバッファ（pH4.0）に溶解し、これに実施例4で調製した酵素標品を上記の酵素標品を50units/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で3時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表6に示す。 *

リン酸供与体	生成 5'-イノシン酸 (g/dl)
トリポリリン酸ナトリウム	1.20
ポリリン酸ナトリウム	1.79
フェニルリン酸ジナトリウム	1.50
カルバミルリン酸ジナトリウム	1.53

【0087】実施例7 モルガネラ・モルガニ染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離

(1) N末端アミノ酸配列の決定

モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の無細胞抽出液から実施例1記載の方法に従い精製した酸性フォスファターゼをDITCメンブレン（Milligen/Bioscience社製）に吸着させ、Prosequencer 6625（Milligen/Bioscience社製）を用いてN末端のアミノ酸配列を決定した。配列表配列番号1に示した20残基のN末端アミノ酸配列が決定された。

【0088】(2) 酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の単離

モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466の培養菌体からMurray and Thomsonの方法（Nucl. Acid Res., 4321, 8 (1980)）に従い、染色体DNAを調製した。これを制限酵素Sau3AIで部分分解した後、シヨ糖密度勾配遠心分離により3～6kbpのDNA断片を分画した。プラスミドベクターpUC118（宝酒造社製）を制限酵素BamHIで切断し、部分分解した染色体DNA断片と連結させた。DNAの連結はDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用い、指定された方法にて行った。次いで、得られたDNA混合物を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造社製）を形質転換した。形質転換体をアンピシリン100μg/mlを含むL寒天培地上にプレーティングして生育させ、遺伝子ライブラリーを作成した。

【0089】形質転換体の生育した寒天培地の表面に4mM p-ニトロフェニルリン酸及び100mM メス/NaOH バッファ（pH6.5）を含む反応液を注ぎ、30℃で15分間保温した。フォスファターゼ活性を発現した菌は、p-ニトロフェニルを遊離して黄色を示すため、これを指標として形質転換体を選択した。約20,000株の形質転換体の遺伝子発現ライブラリーを探索した結果、フォスファターゼ活性を発現した形質転換体30株が得られた。

【0090】フォスファターゼ活性を発現した30株の形質転換体を単コロニー分離し、アンピシリン100μg/mlを含むL培地2.5mlに接種し、37℃で16時間培養した。

培養液より集菌した菌体にイノシン2g/dl及びピロリン酸

*【0085】いずれのリン酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリリン酸ナトリウムをリン酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0086】

【表6】

ナトリウム10g/dlを含む100mM酢酸ナトリウムバッファ（pH5.0）50μlを添加し、30℃で16時間反応を行った。HPLC分析にて5'-イノシン酸の生成を検出し、リン酸転移活性を持つ菌株を選択した。その結果、リン酸転移活性を示し、目的の酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体5株を得ることができた。

20 【0091】実施例8 モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例7で得られたモルガネラ・モルガニ NCIMB10466由来酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体の1株より、アルカリ溶菌法（Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p1.25 (1989)）によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。なお、このプラスミドをpMPI501と命名した。決定した挿入DNA断片の制限酵素地図を図3に示す。

【0092】さらにサブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素HindIIIと制限酵素EcoRIで切り出される1.2Kbpの大きさの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のために、この1.2kbpの断片をHindIII及びEcoRIで切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。pMPI505と命名したこのプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造（社）製）を形質転換し、これを100μg/mlのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

【0093】pMPI505を保有するエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造製）の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオケミカル社製）を用い、サンガーらの方法（J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)）に従って行った。決定したオープン・リーディング・フレ

ームの塩基配列を配列表配列番号2に示した。また、この塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号3に示した。このアミノ酸配列中に精製酵素のN末端アミノ酸配列と完全に一致する配列が存在した。精製酵素のN末端は配列番号3に示される配列の21番目のアラニン残基から開始していたため、配列番号3に示されるアミノ酸配列は前駆体蛋白質の配列であり、1番目のメチオニン残基から20番目のアラニン残基までのペプチドは翻訳後に除去されるものと考えられた。これより推定される成熟蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号4に示した。アミノ酸配列から予想される成熟蛋白質の分子量は24.9キログルトンと算出され、精製酵素のSDS-PAGEの結果とよく一致した。以上の結果及び本断片を含むプラスミドを有する形質転換体が磷酸転移活性を示すことから本オープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼをコードする領域であると同定した。

【0094】塩基配列、アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースはEMBL及びSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号2に示される塩基配列は、既知のモルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子(Thaller, M. C. et. al. Microbiology, 140, 1341 (1994))では、54番目のGがA、72番目のGがA、276番目のTがG、378番目のTがC、420番目のGがT、525番目のCがG、529番目のCがT、531番目のGがAである以外は配列が一致し、また、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列は、モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼと同一であることが判明した。すなわち、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が、モルガネラ・モルガニNCIMB 10466の酸性フォスファターゼ遺伝子である。

【0095】なお、前駆体蛋白質は249個のアミノ酸か *

*ら成り、その配列から予想される蛋白質の分子量は27.0キログルトンであった。

【0096】また、pMPI505をエシェリヒア・コリ JM 109に保持させた株は、AJ13143と命名され、平成8年2月23日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)にブタベスト条約に基づき国際寄託され、受託番号FERM B P-5422が付与されている。

【0097】実施例9 モルガネラ・モルガニ NCIMB 10466由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の発現による活性の増幅

実施例8にて構築したエシェリヒア・コリ JM109/pMPI505をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mM磷酸カリウムバッファー(pH7.0)に懸濁し、4°Cで20分間超音波処理を行い破砕した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0098】得られた無細胞抽出液の磷酸転移活性を、プラスミドpUC118で同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109及びモルガネラ・モルガニ野生株より調製した無細胞抽出液の活性を対照として測定した結果を表7に示した。エシェリヒア・コリ JM109/pUC118では磷酸転移活性は検出されず、モルガネラ・モルガニ野生株でも磷酸転移活性は低かった。一方、エシェリヒア・コリ JM109/pMPI505はモルガネラ・モルガニ野生株に比べて比活性で150倍と高い磷酸転移活性を示しており、この結果から導入したDNA断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

【0099】

【表7】

菌 株	磷酸転移活性(units/mg)
モルガネラ・モルガニ NCIMB10466	0.008
エシェリヒア・コリ JM109/pUC118	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109/pMPI505	1.250

【0100】実施例11 エシェリヒア・ブラッタエ染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離

(1) N末端アミノ酸配列の決定

エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650の無細胞抽出液から精製した酸性フォスファターゼをDITCメンブレン(ミリジェン/バイオサーチ社製)に吸着させ、Prosequencer 6625(ミリジェン/バイオサーチ社製)を用いてN末端のアミノ酸配列を決定した。配列表配列番号5に示す15残基のN末端アミノ酸配列が決定された。

【0101】(2) 酸性フォスファターゼをコードする遺伝子断片の単離

エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650の培養菌体からMur 50

ray and Thomsonの方法(Nucl. Acid Res., 4321, 8 (1980))に従い、染色体DNAを調製した。これをSau 3AIで部分分解した後、ショ糖密度勾配遠心分離により3~6KbpのDNA断片を分画した。プラスミドベクターpUC118(宝酒造社製)をBamHIで切断し、部分分解した染色体DNA断片と連結させた。DNAの連結はDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用い、指定された方法にて行った。次いで、得られたDNA混合物を用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109(宝酒造社製)を形質転換した。形質転換体をアンピシリン100 μ g/mlを含むL寒天培地上にプレーティングして生育させ、遺伝子ライブラリーを作成した。

【0102】形質転換体の生育した寒天培地の表面に4

mM p-ニトロフェニルリン酸及び100mM メス/NaOH バッファー (pH6.5) を含む反応液を注ぎ、30°Cで15分間保温した。フォスファターゼ活性を発現した菌は、p-ニトロフェノールを遊離して黄色を示すため、これを指標として、形質転換体を選択した。約8,000株の形質転換体の染色体遺伝子発現ライブラリーを探索した結果、フォスファターゼ活性を発現した形質転換体14株が得られた。

【0103】フォスファターゼ活性を発現した14株の形質転換体を単コロニー分離し、アンピシリン100 μ g/mlを含むL培地2.5mlに接種し、37°Cで16時間培養した。培養液から集菌した菌体にイノシン2g/dl及びピロリン酸ナトリウム10g/dlを含む100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH5.0) 50 μ lを添加し、30°C 16時間反応を行った。HPLC分析にて5'-イノシン酸の生成を検出し、リン酸転移活性を持つ菌株を選択した。その結果、リン酸転移活性を示し、目的の酸性フォスファターゼ遺伝子断片を保有すると予想される形質転換体3株を得ることができた。

【0104】実施例12 エシェリヒア・ブラッカエ JCM 1650由来酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例11で得られたエシェリヒア・ブラッカエ JCM 1650由来酸性フォスファターゼ遺伝子を含むDNA断片を保有すると予想される形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpEPI301と命名した。決定した挿入されたDNA断片の制限酵素地図を図5に示す。

【0105】さらにサブクロニングにより酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素C1aIとBamHIで切り出される2.4kbpの大きさの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のために該断片をC1aI及びBamHIで切断したpBluescript KS (+) (ストラテジーン社製) に結合したプラスミドDNAを構築した。pEPI305と命名したこのプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) を形質転換し、これをアンピシリン100 μ g/mlを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

【0106】pEPI305を保有するエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。決定したオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表配列番号6に示した。この塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号7に示した。このアミノ酸配列中に精製酵素のN末端アミノ酸配列と完全に一致する配列が存在した。精製酵素のN末端は配列表配列番号7の配列の19番目のロイシン残基から開始していたため、配列番号7に示されるアミノ酸配列は前駆

体蛋白質の配列であり、1番目のメチオニン残基から18番目のアラニン残基までのペプチドは翻訳後に除去されるものと考えられた。これより推定される成熟蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号8に示した。これより予想される成熟蛋白質の分子量は25.1キロダルトンと算出され、精製酵素SDS-PAGEの結果とよく一致した。以上の結果及び本断片を含むプラスミドを有する形質転換体がリン酸転移活性を示すことから本オープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼをコードする領域であると同定した。

【0107】すなわち、配列表番号8に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が、エシェリヒア・ブラッカエ JCM 1650の酸性フォスファターゼ遺伝子である。

【0108】塩基配列、アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースはEMBL及びSWISS-PROTである。その結果、配列表番号5に示される蛋白質及びそれをコードするDNAは新規であることが判明した。本遺伝子のコードする前駆体蛋白質は249個のアミノ酸から成り、その配列から予想される蛋白質の分子量は27.0キロダルトンであった。

【0109】アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った結果、本蛋白質はプロビデンシア・スチュアルティ (*Providencia stuartii*) の酸性フォスファターゼと77.4%、実施例8のモルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*) の酸性フォスファターゼと77.1%、サルモネラ・チヒムリウム (*Salmonella typhimurium*) の酸性フォスファターゼと44.3%の相同性を示した。

【0110】なお、pEPI305をエシェリヒア・コリ JM109に保持させた株は、AJ13144と命名され、平成8年2月23日付で工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) にブタベスト条約に基づき国際寄託され、受託番号FERM B P-5423が付与されている。

【0111】実施例13 エシェリヒア・ブラッカエ JCM 1650 由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の発現による活性の増幅

実施例12で作成したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mMリン酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁し、4°Cで20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0112】得られた無細胞抽出液のリン酸転移活性を、プラスミドpBluescript KS (+) で同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109及びエシェリヒア・ブラッカ

10

20

30

40

50

エ野生株より調製した無細胞抽出液を対照として測定した結果を表8に示した。エシェリヒア・コリ JM109/pBluescript KS (+) では磷酸転移活性は検出されず、エシェリヒア・ブラッタエ野生株でも磷酸転移活性は低かった。一方、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI305はエシェリヒア・ブラッタエ野生株に比べて比活性で120倍 *

菌 株	磷酸転移活性(units/mg)
エシェリヒア・ブラッタエ JCM1650	0.002
エシェリヒア・コリ JM109/pBluescript KS(+)	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109/pEPI305	0.264

【0114】実施例14 エシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650 由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産

ピロ磷酸ナトリウム12g/dl及びイノシン 6 g/dlを100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記のエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で10時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5'-イノシン酸のみで2'-イノシン酸及び3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図6に示す。本菌を用いたピロ磷酸とイノシンからの5'-イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で5'-イノシン酸が生成蓄積した。

【0115】実施例15 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子の作成

実施例13及び14に示したようにエシェリヒア・ブラッタエ由来酸性フォスファターゼ遺伝子保持株は著量の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロ磷酸とイノシンからの5'-イノシン酸生産反応においては、非常に効率よく短時間で5'-イノシン酸が生成蓄積する。しかし、生成した5'-イノシン酸が酸性フォスファターゼ自体が有する磷酸エステル加水分解活性によって分解を受けるために5'-イノシン酸の蓄積量がある程度以上上がらないことが判明した。そこで実施例11にてクローニングしたエシェリヒア・ブラッタエ由来酸性フォスファターゼ遺伝子にPCRを用いる部位特異的変異法により変異を導入し酵素の性質の改良を行うこととした。

【0116】DNA合成装置(アプライドバイオシステム社製モデル394)を用いてホスホアミダイト法にて配列表配列番号9、10及び11に示すオリゴヌクレオチドMUT300、MUT310及びMUT320をそれぞれ合成した。

【0117】鋳型として実施例12で調製したプラスミドpEPI305 1ng、プライマーとしてM13プライマーRV (宝酒造社製)及びMUT310オリゴヌクレオチド各2.5μmol及びタックDNAポリメラーゼ(宝酒造社製) 2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200μM、塩化カリウム 50mM及び塩化マグネシウム 1.5mMを含む100mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.3) 100μlに添加し、94℃を30

*と高い磷酸転移活性を示しており、この結果から導入したDNA断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

【0113】

【表8】

秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを25回繰り返すPCR反応を行った。PCR反応はサーマルサイクラーPJ2000型(宝酒造社製)を用いて行った。また別に、鋳型としてプラスミドpEPI305 1ng、プライマーとしてM13プライマーM3 (宝酒造社製)及びMUT300オリゴヌクレオチド各2.5μmolを用いて同様にPCR反応を行った。それぞれの反応液をマイクロスピナラムS-400 (ファルマシア社製)を用いてゲル濾過により精製し、プライマーを除去した。

【0118】それぞれのPCR反応液1μlをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200μM、塩化カリウム 50mM及び塩化マグネシウム 1.5mMを含む100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3) 95μlに添加し、94℃で10分加熱後、60分間かけて37℃まで冷却した後、37℃で15分保温しヘテロ二本鎖を形成させた。これにタックDNAポリメラーゼ2.5ユニットを添加して72℃で3分反応を行い、ヘテロ二本鎖を完成させた。次に、この反応液にM13プライマーRV及びM13プライマーM3各2.5μmolを添加して、94℃を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを10回繰り返すPCR反応を行った。

【0119】2回目のPCR反応の生成物をClaIとBamHIで切断後フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。このDNA断片をClaIとBamHIで切断したpBluescript KS (+) に結合し、得られたプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製)を形質転換した。これを100μg/mlのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。

【0120】形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。このようにして成熟蛋白質の74番目のグリシン残基 (GGG) がアスパラギン酸残基 (G*A*T) に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI310と命名した。

【0121】鋳型としてpEPI305、プライマーとしてMUT300とMUT320オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の153番目のイソロイシン残基 (ATC) がスレオニン残基 (A*CC) に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異

型遺伝子を含むプラスミドをpEPI320と命名した。さらに鋳型としてpEPI310、プライマーとしてMUT300とMUT320オリゴヌクレオチドを用いて同様の操作により、成熟蛋白質の74番目のグリシン残基 (GGG) がアスパラギン酸残基 (G→A→T) に、153番目のイソロイシン残基 (ATC) がスレオニン残基 (A→CC) に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作成した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI330と命名した。

【0122】それぞれの変異型遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI310、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI320、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1 mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5 mlの100mM磷酸カリウムバッファー *

* (pH7.0) に懸濁し、4°Cで20分間超音波処理を行い破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液の磷酸エステル加水分解活性及び磷酸転移活性をpH4.0にて測定し、野生株のものと比較した。

【0123】野生型および磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼの磷酸エステル加水分解活性及び磷酸転移活性を測定した結果を表9に示す。磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼは、野生型酸性フォスファターゼと比較して、磷酸エステル加水分解活性と磷酸転移活性がいずれも低下していたが、磷酸エステル加水分解活性の方が低下の程度が大きく、その結果、変異型酸性フォスファターゼの磷酸エステル加水分解活性/磷酸転移活性の比は野生型酸性フォスファターゼに比べて低くなっていた。

【0124】

【表9】

プラスミド	磷酸エステル分解活性 (units/mg)	磷酸転移活性 (units/mg)	分解活性/転移活性 (相対値)
pEPI305	2.38	0.132	18.03 (100)
pEPI310	0.26	0.019	13.68 (76)
pEPI320	0.88	0.123	7.15 (39)
pEPI330	0.42	0.070	6.00 (33)

【0125】実施例16 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産

磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI310、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI320、エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330及び野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI305をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1 mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。

【0126】ピロ磷酸ナトリウム12g/dl及びイノシン6 g/dlを酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記培養で得たエシェリヒア・コリ各菌株の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35°Cで32時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。結果を図7に示す。

【0127】図7中、縦軸は5'-イノシン酸の濃度 (mg/dl) を、横軸は反応時間 (h) を、また黒埋め円形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI305、黒埋め三角形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI310、白抜き円形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI320、白抜き四角形はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109/pEPI330の各菌体を使用した場合の反応の推移を示す。

【0128】磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォ

スファターゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸の生産反応においては生成した5'-イノシン酸の分解速度が低下しており、その結果として5'-イノシン酸の収率及び蓄積量が向上した。74番目のグリシン残基及び153番目のイソロイシン残基がそれぞれアスパラギン酸残基及びスレオニン残基へと置換された磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株エシェリヒア・コリ JM109/pEPI330が最も高い5'-イノシン酸の蓄積を示した。

【0129】実施例17 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種ヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生産

磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI330をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1 mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。ピロ磷酸ナトリウム12g/dl及び磷酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン6g/dlを100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH4.5) に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35°Cで32時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-磷酸エステルの量を表10に示した。なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-磷酸エステルのみでヌクレオシド-2'-磷酸エステル及びヌクレオシド-3'-磷酸エステルの副生は全く認められなかった。

【0130】

【表10】

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	7.45
グアノシン	5'-グアニル酸	4.77
ウリジン	5'-ウリジル酸	8.93
シチジン	5'-シチジル酸	6.60

【0131】実施例18 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いる各種磷酸化合物を磷酸供与体とする5'-イノシン酸の生産
 磷酸エステル加水分解活性低下型酸性フォスファターゼ 10
 遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEPI330をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。イノシン6g/dl及び磷酸供与体としてトリポリ磷酸*

磷酸供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dl)
トリポリ磷酸ナトリウム	5.96
ポリ磷酸ナトリウム	8.84
フェニル酢酸ジナトリウム	7.60
カルバミル磷酸ジナトリウム	7.73

【0133】実施例19 エシェリヒア・ブラッタエJ CM1650 由来新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子の作製および変異型酸性フォスファターゼ遺伝子の酵素学的性質の検討

実施例19～22においては、ヌクレオシドへの磷酸転移活性の測定は次の条件で行った。イノシン40 μ mol/ml、ヒロ磷酸ナトリウム100 μ mol/ml、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) 100 μ mol/mlおよび酵素を含む反応液 (1ml) でpH4.0、30°Cで10分反応を行った。2N塩酸200 μ lを添加して反応を停止した後、遠心分離により沈澱を除き、磷酸転移反応により生成した5'-イノシン酸を上 30
 記の条件で定量した。この標準反応条件にて1分間に1 μ molのイノシン酸を生成する酵素量を1unitと定めた。

【0134】また、上記の組成の反応条件においてイノシン濃度を10から100 μ mol/mlまで変化させて磷酸転移活性を測定し、Hanes-Woolfプロット (Biochem.J., 26, 1406(1932)) により磷酸転移反応におけるイノシンの速度定数を求めた。

【0135】後述するように実施例15に記載のヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生産性が向上した変異型 40
 酵素について、詳細な分析を行った結果、変異型酵素は野生型酵素に比べてヌクレオシドに対する親和性が2倍程度に向上していることが明らかになった。そこで本発明者らは、さらに該酵素のヌクレオシドに対する親和性を上げればヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生産性が向上するであろうと考え、遺伝子工学的手法を用いてさらなる酵素の改変を行った。

【0136】実施例15に記載のエシェリヒア・ブラッタエJ CM1650 由来野生型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドpEPI305を用い、この 50

*ナトリウム、ポリ磷酸ナトリウム (商品名: ポリゴン P、千代田化学 (株) 製品)、フェニル酢酸ジナトリウム又はカルバミル磷酸ジナトリウム12g/dlを100mM酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35°Cで32時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表11に示した。いずれの磷酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ磷酸を磷酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0132】

【表11】

プラスミドDNAに遺伝子工学的手法により部位特異的変異を導入し、変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を作製した。pEPI305はエシェリヒア・ブラッタエJ CM1650 に由来する野生型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含む、制限酵素ClaIと制限酵素BamHIで切り出される2.4Kbpの大きさのDNA断片を、ClaI及びBamHIで切断したpBluescript KS(+) (ストラテジーン社製) に結合したプラスミドDNAであり、該酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の塩基配列は配列表配列番号6に示される配列である。また、この塩基配列より予想される前駆体蛋白質のアミノ酸配列は配列表配列番号7に示される配列である。そして精製酵素の分析結果 (実施例4に記載) から成熟蛋白質のアミノ酸配列は配列表配列番号8に示される配列であると推定される。

【0137】DNA合成装置 (アプライドバイオシステム社製モデル394) を用いてホスホアミダイト法にて配列表に示す配列のオリゴヌクレオチドMUT300 (配列表配列番号9)、MUT310 (配列表配列番号10)、MUT320 (配列表配列番号11)、MUT330 (配列表配列番号12)、MUT340 (配列表配列番号13)、MUT350 (配列表配列番号14)、MUT360 (配列表配列番号15)、MUT370 (配列表配列番号16)、MUT380 (配列表配列番号17) およびMUT390 (配列表配列番号18) を合成した。

【0138】鋳型としてpEPI305 1ng、プライマーとしてM13プライマーRV (宝酒造社製) およびMUT310オリゴヌクレオチド各2.5 μ molおよびタックDNAポリメラーゼ (宝酒造社製) 2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、塩化カリウム

【0139】50mMおよび塩化マグネシウム 1.5mMを含

む100mM トリスー塩酸緩衝液 (pH8.3) 100 μ lに添加し、94°Cを30秒、55°Cを2分、72°Cを3分のサイクルを25回繰り返すPCR反応を行った。PCR反応はサーマルサイクラーPJ2000型 (宝酒造社製) を用いて行った。また別に、鋳型としてプラスミドDNA pEPI305 1ng、プライマーとしてM13プライマー-M3 (宝酒造社製) およびMUT300オリゴヌクレオチド各2.5 μ molを用いて同様にPCR反応を行った。それぞれの反応液をマイクロスピニングカラムS-400 (ファルマシア社製) を用いてゲル濾過により精製し、プライマーを除去した。

【0140】それぞれのPCR反応液1 μ lをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、塩化カリウム 50mMおよび塩化マグネシウム 1.5mMを含む100mM トリスー塩酸緩衝液 (pH8.3) 95 μ lに添加し、94°Cで10分加熱後、60分間かけて37°Cまで冷却した後、37°Cで15分保温しヘテロ二本鎖を形成させた。これにタックDNAポリメラーゼ2.5ユニットを添加して72°Cで3分反応を行い、ヘテロ二本鎖を完成させた。次に、この反応液にM13プライマー-RVおよびM13プライマー-M3各2.5 μ molを添加して、94°Cを30秒、55°Cを2分、72°Cを3分のサイクルを10回繰り返すPCR反応を行った。

【0141】2回目のPCR反応の生成物をClaIとBamHIで切断後フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した。このDNA断片をClaIとBamHIで切断したpBluescript KS (+) に結合し、得

られたプラスミドDNAを用いて常法によりエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換した。これを100 μ g/mlのアンピシリンを含むL寒天培地上にプレーティングし、形質転換体を得た。形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。塩基配列の決定は Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオケミカル社製) を用い、サンガーらの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)) に従って行った。このようにして成熟蛋白質の74番目のグリシン残基 (GGG) がアスパラギン酸残基 (G*A*T) に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作製した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI310と命名した (実施例15)。

【0142】変異を導入したプラスミドを鋳型として同様の操作を繰り返し、累加的に部位特異的変異を導入した。形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。作製した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子と変異部位を表12に示した。変異部位のアミノ酸残基は配列表配列番号8に示した成熟蛋白質のアミノ酸配列中のアミノ酸残基を示している。

【0143】

【表12】

プラスミド名	変異を導入したプラスミド	変異導入に用いたプライマー	変異点及びアミノ酸置換
pEPI305	-		野生型
pEPI310	pEPI305	MUT300 MUT310	74Gly(GGG)→Asp(G*A*T)
pEPI330	pEPI310	MUT300 MUT320	74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)
pEPI340	pEPI330	MUT300 MUT330	63Leu(CTG)→Gln(C*AG) 65Ala(GCG)→Gln(*C*AG) 66Glu(GAA)→Ala(G*CA) 74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)
pEPI350	pEPI340	MUT300 MUT340	63Leu(CTG)→Gln(C*AG) 65Ala(GCG)→Gln(*C*AG) 66Glu(GAA)→Ala(G*CA) 74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 85Ser(TCC)→Tyr(T*AC) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)
pEPI360	pEPI340	MUT300 MUT350	63Leu(CTG)→Gln(C*AG) 65Ala(GCG)→Gln(*C*AG) 66Glu(GAA)→Ala(G*CA) 74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 135Thr(ACC)→Lys(A*A*A) 136Glu(GAG)→Asp(GA*C) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)
pEPI370	pEPI360	MUT300 MUT360	63Leu(CTG)→Gln(C*AG) 65Ala(GCG)→Gln(*C*AG) 66Glu(GAA)→Ala(G*CA) 69Asn(AAC)→Asp(*GAC) 71Ser(AGC)→Ala(*G*CC) 72Ser(AGT)→Ala(*G*CT) 74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 135Thr(ACC)→Lys(A*A*A) 136Glu(GAG)→Asp(GA*C) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)
pEPI380	pEPI370	MUT300 MUT370	63Leu(CTG)→Gln(C*AG) 65Ala(GCG)→Gln(*C*AG) 66Glu(GAA)→Ala(G*CA) 69Asn(AAC)→Asp(*GAC) 71Ser(AGC)→Ala(*G*CC) 72Ser(AGT)→Ala(*G*CT) 74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 116Asp(GAT)→Glu(GA*A) 135Thr(ACC)→Lys(A*A*A) 136Glu(GAG)→Asp(GA*C) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)
pEPI390	pEPI380	MUT300 MUT380	63Leu(CTG)→Gln(C*AG) 65Ala(GCG)→Gln(*C*AG) 66Glu(GAA)→Ala(G*CA) 69Asn(AAC)→Asp(*GAC) 71Ser(AGC)→Ala(*G*CC) 72Ser(AGT)→Ala(*G*CT) 74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 116Asp(GAT)→Glu(GA*A) 130Ser(TCT)→Glu(*G*A*A) 135Thr(ACC)→Lys(A*A*A) 136Glu(GAG)→Asp(GA*C) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)
pEPI400	pEPI380	MUT300 MUT390	63Leu(CTG)→Gln(C*AG) 65Ala(GCG)→Gln(*C*AG) 66Glu(GAA)→Ala(G*CA) 69Asn(AAC)→Asp(*GAC) 71Ser(AGC)→Ala(*G*CC) 72Ser(AGT)→Ala(*G*CT) 74Gly(GGG)→Asp(G*A*T) 92Ala(GCC)→Ser(*A*GC) 94Ala(GCC)→Glu(G*A*A) 116Asp(GAT)→Glu(GA*A) 135Thr(ACC)→Lys(A*A*A) 136Glu(GAG)→Asp(GA*C) 153Ile(ATC)→Thr(A*CC)

【0144】それぞれの変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ J M109/pEPI330、エシェリヒア・コリ J M109/pEPI340、エシェリヒア・コリ J M109/pEPI350、エシェリヒア・コリ J M109/pEPI360、エシェリヒア・コリ J M109/pEPI370、エシェリヒア・コリ J M109/pEPI380、エシェリヒア・コリ J M109/pEPI390、エシェリヒア・コリ J M109/pEPI400および野生型酸性フォスファターゼ

遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ J M109/pEPI305をアンピシリン100μg/mlおよびIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。それぞれの菌の培養液2Lから遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を50mlの100mM燐酸バッファー(pH7.0)に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

それぞれの無細胞抽出液より実施例4に記載の方法にてそれぞれの酸性フォスファターゼの精製を行った。各酵素標品は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において均一であった。

【0145】精製した各変異型酸性フォスファターゼおよび野生型酸性フォスファターゼの磷酸転移反応におけるイノシンの速度定数を求めた結果を表13に示した。実施例15に記載のヌクレオシド-5'-一磷酸エステルの生産性が向上したエシェリヒア・コリJM109/pEPI330で発現している変異型酵素は、エシェリヒア・コリJM109/pEPI305で発現している野生型酵素に比べてVmaxは低下しているものの、イノシンに対するKm値が大きく低下し、イノシンに対する親和性が2倍以上に向上していることが明らかになった。これより本変異型酵素のヌクレオシド-5'-一磷酸エステルの生産性が飛躍的に向上したのは、ヌクレオチダーゼ活性が低下したためだけでなく、ヌクレオシドに対する親和性が向上したこ

酵素の由来菌株	Km(mM)	Vmax(unit/mg)
エシェリヒア・コリJM109/pEPI305	202	1.83
エシェリヒア・コリJM109/pEPI330	109	1.39
エシェリヒア・コリJM109/pEPI340	83	1.03
エシェリヒア・コリJM109/pEPI350	83	0.93
エシェリヒア・コリJM109/pEPI360	55	1.33
エシェリヒア・コリJM109/pEPI370	42	1.15
エシェリヒア・コリJM109/pEPI380	42	2.60
エシェリヒア・コリJM109/pEPI390	42	2.58
エシェリヒア・コリJM109/pEPI400	43	2.11

【0148】実施例20 新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた5'-イノシン酸の生産変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入した、エシェリヒア・コリJM109/pEPI330、エシェリヒア・コリJM109/pEPI340、エシェリヒア・コリJM109/pEPI360、エシェリヒア・コリJM109/pEPI370、エシェリヒア・コリJM109/pEPI380をアンピシリン100μg/mlおよびIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。ピロリン酸15g/dl、およびイノシン8g/dlを酢酸バッファー(pH4.0)に溶解し、これに上記の変異型および野生型酸性フォスファターゼ遺伝子を導入したエシェリヒア・コリJM109の菌体を乾燥菌体重量で200mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で32時間反応を行い、経時的に生成した5'-イノシン酸の量を測定した。なお、生成したイノシン酸は5'-イノシン酸のみで2'-イノシン酸および3'-イノシン酸の副生は全く認められなかった。結果を図8に示す。

【0149】実施例15に記載のエシェリヒア・コリJM109/pEPI330は高い5'-イノシン酸の蓄積を示すが、基質がまだ残存するにもかかわらず、5'-イノシン酸の蓄積が7.5g/dl程度に達した時点で5'-イノシン酸の生成が停止し、それ以上は蓄積が上がりなかった。それに比べて、新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株はいずれも高い蓄積を示した。なかでもエシェリヒア・コリJM109/pEPI370およびエシェリヒア・コリJM109/pEPI380を用いた反応においては、さらに

*とも重要なファクターとなっていることが示唆された。そこで、さらにヌクレオシドに対する親和性を上昇させれば生産性が向上することが予想された。

【0146】本実施例にて作製した新規変異型酵素遺伝子を導入したエシェリヒア・コリJM109で発現している新規変異型酵素はいずれも実施例15に記載のエシェリヒア・コリJM109/pEPI330のものよりもさらにイノシンに対する親和性が向上しており、ヌクレオシド-5'-一磷酸エステルの生産性が向上していることが期待された。また、エシェリヒア・コリJM109/pEPI380で発現している変異型酵素は、イノシンに対する親和性が向上しているだけでなく、Vmaxも野生型酵素よりも高くなっており、さらにヌクレオシド-5'-一磷酸エステルの生産性が向上していることが期待された。

【0147】

【表13】

高い5'-イノシン酸の蓄積を示した。また、反応速度も速く、5'-イノシン酸の生産性がさらに飛躍的に向上していることが示された。特にエシェリヒア・コリJM109/pEPI380は反応速度が速く、非常に高い生産性を示した。

【0150】実施例21 新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた各種ヌクレオシド-5'-一磷酸エステルの生産新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリJM109/pEPI380をアンピシリン100μg/mlおよびIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。ピロリン酸15g/dl、および磷酸受容体としてイノシン、グアノシン、ウリジンまたはシチジンを8g/dlを100mM酢酸バッファー(pH4.5)に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35℃で12時間反応させた。生成したヌクレオシド-5'-一磷酸エステルの量を表14に示した。いずれのヌクレオシドを用いた場合にも良好に磷酸化反応が進行し、それぞれ対応するヌクレオシド-5'-一磷酸エステルが生成蓄積した。なお、生成したヌクレオチドはヌクレオシド-5'-一磷酸エステルのみでヌクレオシド-2'-一磷酸エステルおよびヌクレオシド-3'-一磷酸エステルの副生は全く認められなかった。

【0151】

【表14】

ヌクレオシド	生成物	生成量 (g/dl)
イノシン	5'-イノシン酸	12.05
グアニン	5'-グアニル酸	5.78
ウリジン	5'-ウリジル酸	13.28
シチジン	5'-シチジル酸	10.65

【0152】実施例22 新規酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いる各種燐酸化合物を燐酸供与体とする5'-イノシン酸の生産

新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリ JM109/pEP1380をアンピシリン100 μ g/mlおよびIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37°Cで16時間培養した。イノシン6g/dl、および燐酸供与体としてトリポリ燐酸、ポリ燐酸(千代田化学(株)製品、商品名「ポリゴンP」、フェニル酢酸ジナトリウム、またはカルバミル燐酸ジナト*

*リウム15g/dlを100mM酢酸バッファー(pH4.0)に溶解し、これに上記の菌体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、35°Cで12時間反応させた。生成した5'-イノシン酸の量を表15に示した。いずれの燐酸供与体を用いた場合にも効率よく5'-イノシン酸が生成蓄積したが、ポリ燐酸を燐酸供与体として用いた場合に最も5'-イノシン酸の蓄積量が高かった。

【0153】

【表15】

燐酸供与体	生成5'-イノシン酸 (g/dl)
トリポリ燐酸ナトリウム	10.84
ポリ燐酸ナトリウム	13.35
フェニル酢酸ジナトリウム	12.84
カルバミル燐酸ジナトリウム	12.42
アセチル燐酸リチウムカリウム	10.65

【0154】実施例23 プロビデンシア・スチュアルティ染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離と塩基配列の確認

既知のプロビデンシア・スチュアルティの酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列(EMBL Accession number X64820)を基に、該酸性フォスファターゼ遺伝子を増幅するようにデザインした配列表配列番号19及び20に示す配列を有するPCR用オリゴヌクレオチドプライマーPRP1及びPRP2を合成した。

【0155】プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29510の培養菌体から、Murry and Thompsonの方法(Nucl. Acid Res., 4321, 8, (1980))に従い染色体DNAを調製した。鋳型としてこの染色体DNA 0.1ng、プライマーとしてPRP1及びPRP2オリゴヌクレオチド各2.5 μ mol並びにタックDNAポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、塩化カリウム50mM及び塩化マグネシウム1.5mMを含む100mMトリス塩酸緩衝液(pH8.3)100 μ lに添加し、94°Cを30秒、55°Cを2分、72°Cを3分のサイクルを30回繰り返すPCR反応を行った。反応液をアガロース電気泳動に供し、増幅された約1kbpのDNA断片をグラスパウダー(宝酒造社製)を用いて回収した。この遺伝子断片をBamHIで切断後、BamHIで切断したpUC118に結合した。このプラスミドをpPRP100と命名した。pPRP100を導入したエシェリヒア・コリ JM109/pPRP100の燐酸エステル加水分解活性及び燐酸転移活性を測定した。その結果、本菌は燐酸エステル加水分解活性だけでなく、ヌクレオシドへの燐酸転移活性も示した。

【0156】エシェリヒア・コリ JM109/pPRP100よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、塩基配列の決

定を行った。決定したオープン・リーディング・フレームの塩基配列及びこの塩基配列より推定される蛋白質のアミノ酸配列を配列表配列番号21及び配列番号22に示した。本オープン・リーディング・フレームの塩基配列は既知のプロビデンシア・スチュアルティの酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列と完全に一致した。

【0157】実施例24 エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・ブランティコラ及びセラチア・フィカリアの染色体からの酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の単離と塩基配列の決定

エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010、クレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939及びセラチア・フィカリア IAM 13540の培養菌体からMurry and Thompsonの方法(Nucl. Acid Res., 4321, 8, (1980))に従い、それぞれの染色体DNAを調製した。ついで、実施例7

(2)と同様の方法により、約20,000株のエシェリヒア・コリ JM109の形質転換体よりなる染色体遺伝子発現ライブラリーをそれぞれ作成し、探索した結果、燐酸転移活性を示す形質転換体を得ることができた。これらの形質転換体はそれぞれの菌株由来の酸性フォスファターゼ遺伝子を保有すると考えられた。

【0158】エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来の酸性フォスファターゼ遺伝子を保有すると考えられるエシェリヒア・コリ JM109形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpENP100と命名した。決定したエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来の挿入DNA断片の制限酵素地図を図9に示す。

【0159】サブクローニングにより、酸性フォスファ

ターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素 *Sa* I と制限酵素 *Kp* n I で切り出される1.6kbpの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のためにこの *Sa* I - *Kp* n I 断片を *Sa* I 及び *Kp* n I で切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。このプラスミドをpENP110と命名した。

【0160】同様に、クレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939由来の酸性フォスファターゼ遺伝子断片を保有すると考えられるエシェリヒア・コリ JM109形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpKLP100と命名した。決定したクレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939由来の挿入DNA断片の制限酵素地図を図10に示す。

【0161】サブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素 *Kp* n I と制限酵素 *Eco* R I で切り出される2.2kbpの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のためにこの *Kp* n I - *Eco* R I 断片を *Kp* n I と *Eco* R I で切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。このプラスミドをpKLP110と命名した

【0162】また、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の酸性フォスファターゼ遺伝子断片を保有すると考えられるエシェリヒア・コリ JM109形質転換体の1株よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製し、挿入されたDNA断片の解析を行った。このプラスミドをpSEP100と命名した。決定したセラチア・フィカリア IAM 13540由来の挿入DNA断片の制限酵素地図を図11に示す。

【0163】サブクローニングにより、酸性フォスファターゼ遺伝子領域を限定した結果、制限酵素 *H* i n d III で切り出される1.4kbpの断片中に本酸性フォスファターゼ遺伝子が含まれることが示唆された。そこで塩基配列の決定のためにこの *H* i n d III 断片を *H* i n d III で切断したpUC118に結合したプラスミドDNAを構築した。このプラスミドをpSEP110と命名した。

【0164】pENP110、pKLP110及びpSEP110をそれぞれ導入したエシェリヒア・コリ JM109/pENP110、エシェリヒア・コリ JM109/pKLP110及びエシェリヒア・コリ JM109/pSEP110の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりそれぞれのプラスミドを調製し、実施例8の方法に従い、挿入断片の塩基配列の決定を行った。決定したそれぞれの挿入断片のオープン・リーディング・フレームの塩基配列のうちエンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来のものを配列表配列番号23に、クレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939由来のものを配列表配列番号25に、そしてセラチア・フィカリア IAM 13540由来のものを配列表配列番号27に示した。また、各々の推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号24、26、28に示

した。各DNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体が磷酸転移活性を示したことから、これらのオープン・リーディング・フレームは目的の酸性フォスファターゼ遺伝子であると同定した。

【0165】塩基配列、アミノ酸配列各々について既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースはEMBL及びSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号23、25及び27に示される遺伝子はいずれも新規な遺伝子であることが判明した。また、エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010由来の遺伝子がコードする蛋白質は248個、クレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939由来の遺伝子がコードする蛋白質は248個、セラチア・フィカリア IAM 13540由来の遺伝子がコードする蛋白質は244個のアミノ酸からそれぞれなるものと推定された。なお、これらの蛋白質は、モルガネラ・モルガニ及びエシェリヒア・ブラッタエの酸性フォスファターゼの場合と同様、前駆体蛋白質である可能性がある。

【0166】また、これらの塩基配列より予想される蛋白質のアミノ酸配列を実施例8で推定したモルガネラ・モルガニ NCIMB 10466、実施例12で推定したエシェリヒア・ブラッタエ JCM 1650及び既知のプロビデンシア・スチュアルティ (EMBL Accession number X64820) の酸性フォスファターゼの前駆体蛋白質のアミノ酸配列と共にアミノ酸の一字表記で図12に示した。図中ですべてのアミノ酸配列において共通のアミノ酸残基を配列の下に*で示した。

【0167】図12に示したように6種類の菌株由来の酸性フォスファターゼのアミノ酸配列は非常に相同性が高く、130個のアミノ酸残基がすべてのアミノ酸配列において共通していた。これより、これらの酸性フォスファターゼは非常に類似する機能を持つことが予想される。

【0168】実施例25 プロビデンシア・スチュアルティ、エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・ブランティコラ 及びセラチア・フィカリア由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の発現による活性の増幅
実施例23にて構築したエシェリヒア・コリ JM109/pPR P100、実施例24にて構築したエシェリヒア・コリ JM109/pENP110、エシェリヒア・コリ JM109/pKLP110及びエシェリヒア・コリ JM109/pSEP110をアンピシリン100 μ g/ml及びIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37 $^{\circ}$ Cで16時間培養した。該培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mM磷酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで20分間超音波処理を行い破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0169】得られた無細胞抽出液の磷酸転移活性を、プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851、エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010、クレブシエラ・

ブランティコラ IF0 14939、セラチア・フィカリア IAM 13540及びプラスミドpUC118で同様に形質転換したエシェリヒア・コリ JM109より調製した無細胞抽出液の活性を対照として測定した結果を表16に示した。いずれの菌も野生株の磷酸転移活性は低かった。また、エシェリヒア・コリ JM109/pUC118では磷酸転移活性は検出されなかった。一方、酸性フォスファターゼ遺伝子を導入し*

*たエシェリヒア・コリ JM109の形質転換体はいずれも野生株に比べて高い磷酸転移活性を示しており、この結果から導入した遺伝子断片がエシェリヒア・コリにおいて酸性フォスファターゼを高発現していることが示された。

【0170】

【表16】

菌 株	磷酸転移活性 (units/mg)
プロビデンシア・スチュアルティ ATCC 29851	0.006
エンテロバクター・アエロゲネス IF0 12010	0.002
クレブシエラ・ブランティコラ IF0 14939	0.002
セラチア・フィカリア IAM 13540	0.001
エシェリヒア・コリ JM109 / pUC118	検出せず
エシェリヒア・コリ JM109 / pPRP100	0.833
エシェリヒア・コリ JM109 / pENP110	0.301
エシェリヒア・コリ JM109 / pKLP110	0.253
エシェリヒア・コリ JM109 / pSEP110	0.123

【0171】実施例26 温度安定性の向上した変異型酸性フォスファターゼ遺伝子の作製

実施例20、21および22に記載したように実施例19にて作製したエシェリヒア・ブラッタエ由来変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株は著量の酸性フォスファターゼを発現し、本菌を用いたピロリン酸とイノシンからの5'-イノシン酸生産反応においては、高い変換収率で5'-イノシン酸が生成蓄積した。本酸性フォスファターゼの反応至適温度は35℃であったが、この反応をより高温で行えれば反応速度が上昇し、かつ反応液中のリン酸受容体のヌクレオシド濃度を上げて反応を行えるため、さらに短時間で効率的にヌクレオシド-5'-磷酸エステルの製造が可能になると予想された。そこで実施例19にてクローニングしたエシェリヒア・ブラッタエ由来酸性フォスファターゼ遺伝子にPCRを用いる部位特異的変異法により変異を導入し酵素の温度安定性を向上させることとした。

【0172】実施例19記載のエシェリヒア・ブラッタエJCM1650由来変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドpEPI380を用い、このプラスミドDNAに遺伝子工学的手法により部位特異的変異を導入し、温度安定性の向上した変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を作製した。pEPI380はエシェリヒア・ブラッタエJCM1650に由来する変異型酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含む制限酵素C1aIと制限酵素BamHIで切り出される2.4Kbpの大きさのDNA断片を、C1aI及びBamHIで切断したpBluescript KS(+) (ストラテジーン社製)に結合したプラスミドDNAである。該酸性フォスファターゼをコードする遺伝子の塩基配列より予想される成熟蛋白質のアミノ酸配列は配列表配列番号8に示される配列のうち、実施例19中の表12に示した11個のアミノ酸残基がそれぞれ置換された配列であると推定される。DNA合成装置(アプライドバイオシステム社製モデル

394)を用いてホスホアミダイト法にて配列表に示す配列のオリゴヌクレオチドMUT300(配列表配列番号9)、MUT400(配列表配列番号29)、MUT410(配列表配列番号30)を合成した。

【0173】鋳型として実施例19記載のpEPI380、変異導入用プライマーとしてMUT300およびMUT410を用いて、実施例15と同様にしてPCRを用いる方法によって、成熟蛋白質の104番目のグルタミン酸残基(GAG)がグリシン残基(GGT*)に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作製した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI410と命名した。また、同様に鋳型としてpEPI380、変異導入用プライマーとしてMUT300およびMUT310オリゴヌクレオチドMUT420を用いて151番目のスレオニン残基(ACC)がアラニン残基(GCC)に置換した変異型フォスファターゼをコードする変異型遺伝子を作製した。この変異型遺伝子を含むプラスミドをpEPI420と命名した。

【0174】変異型フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドpEPI410およびpEPI420を導入したエシェリヒア・コリJM109の形質転換体よりアルカリ溶菌法によりプラスミドを調製して塩基配列の決定を行い、目的の塩基が置換されていることを確認した。

【0175】本実施例にて作製した変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリJM109/pEPI410、エシェリヒア・コリJM109/pEPI420、および実施例19記載のエシェリヒア・コリJM109/pEPI380をアンピシリン100μg/mlおよびIPTG 1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。それぞれの菌の培養液50mlから遠心分離により菌体を集め、生理食塩水で1回洗浄した。菌体を5mlの100mM磷酸バッファー(pH7.0)に懸濁し、4℃で20分間超音波処理を行い菌体を破碎した。処理液を遠心分離して不溶性画分を除き、無細胞抽出液を調製した。

【0176】各菌株より調整した無細胞抽出液を0℃から80℃までの各温度にてpH7.0で30分保温した。保温後、各温度で処理した無細胞抽出液を用いて標準反応条件のpH4.0、30℃にて磷酸転移反応を行い、残存活性を測定した。その結果を図13に示した。実施例19記載のエシェリヒア・コリJ M109/pEPI380で発現している変異型酵素は、40℃、30分処理では安定であったが、それ以上の温度では活性の低下が見られた。それに比べ本実施例にて作製した新規変異型酵素遺伝子を導入したエシェリヒア・コリJ M109/pEPI410およびエシェリヒア・コリJ M109/pEPI420で発現している新規変異型酵素はいずれも温度安定性が向上しており、50℃、30分処理でも活性の低下が見られなかった。これらの菌を用いてヌクレオシド-5'-磷酸エステル生産反応を高温で行えば、さらに生産性が向上することが期待された。

【0177】実施例27 温度安定性の向上した変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた5'-イノシン酸および5'-グアニル酸の生産

変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を含むプラスミドを導入したエシェリヒア・コリJ M109/pEPI410、エシェリヒア・コリJ M109/pEPI420および実施例19記載のエシェリヒア・コリJ M109/pEPI380をアンピシリン100μg/mlおよびIPTG1mMを含むL培地50mlに接種し、37℃で16時間培養した。ピロ磷酸15g/dl、およびイノシン8g/dlまたはグアノシン8g/dlを酢酸バッファー(pH4.0)に溶解し、これに各変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を導入したエシェリヒア・コリJ M109の菌 *

*体を乾燥菌体重量で100mg/dlとなるように添加し、pHを4.0に維持しながら、50℃で9時間反応を行い、生成した5'-イノシン酸または5'-グアニル酸の量を測定した。その結果を表17に示した。なお、生成したヌクレオシド磷酸エステルはヌクレオシド-5'-磷酸エステルのみでヌクレオシド-2'-磷酸エステルおよびヌクレオシド-3'-磷酸エステルの副生は全く認められなかった。対照としてエシェリヒア・コリJ M109/pEPI380の菌体を用いて同様に35℃で12時間反応を行った結果を示した。

【0178】実施例21に記載したようにエシェリヒア・コリJ M109/pEPI380は効率的にヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成蓄積した。これと比較すると、実施例26で作製したエシェリヒア・ブラッタエ由来の新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子を導入したエシェリヒア・コリJ M109/pEPI410およびエシェリヒア・コリJ M109/pEPI420は50℃で反応を行った場合に、同等の5'-イノシン酸または5'-グアニル酸をより短い反応時間で生成蓄積し、さらに効率的なヌクレオシド-5'-磷酸エステルの生産が可能であった。特にエシェリヒア・コリJ M109/pEPI420を用いた反応においては、反応時間が短縮されるだけでなく、5'-イノシン酸および5'-グアニル酸の蓄積も向上し、非常に高い生産性を示した。

【0179】

【表17】

菌株	反応温度 (℃)	反応時間 (h)	生成5'- イノシン酸 (g/dl)	生成5'- グアニル酸 (g/dl)
エシェリヒア・コリ J M109/pEPI380	30	12	12.05	5.76
エシェリヒア・コリ J M109/pEPI410	50	9	11.85	5.80
エシェリヒア・コリ J M109/pEPI420	50	9	12.60	6.11

【0180】

【配列表】

【0181】配列番号1の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

50 (ii) 配列の種類: タンパク質

(v) フラグメント型: N末端フラグメント

*nii)

(vi) 起源:

(B)株名: NCIMB 10466

(A)生物名: モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*)

(xi) 配列: SEQ ID NO:1:

Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro Asp Leu Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Leu Lys Asn Glu
 20

【0182】配列番号2の配列の情報:

※(B)株名: NCIMB 10466

(i) 配列の性質:

10 (ix) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 750 bases

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 配列の型: 核酸

(B) 存在位置: 1..747

(C) 鎖の数: 二本鎖

(ix) 配列の特徴:

(D) トポロジー: 直鎖状

(A) 特徴を表す記号: sig_peptide

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(B) 存在位置: 1..60

(vi) 起源:

(ix) 配列の特徴:

(A)生物名: モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*)

(A) 特徴を表す記号: mat_peptide

nii)

※ (B) 存在位置: 61..747

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

ATG AAG AAG AAT ATT ATC GCC GGT TGT CTG TTC TCA CTG TTT TCC CTT 48
 Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu
 -20 -15 -10 -5
 TCC GCG CTG GCC GCG ATC CCG GCG GGC AAC GAT GCC ACC ACC AAG CCG 96
 Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 1 5 10
 GAT TTA TAT TAT CTG AAA AAT GAA CAG GCT ATC GAC AGC CTG AAA CTG 144
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu
 15 20 25
 TTA CCG CCA CCG CCG GAA GTC GGC AGT ATT CAG TTT TTA AAT GAT CAG 192
 Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln
 30 35 40
 GCA ATG TAT GAG AAA GGC CGT ATG CTG CGC AAT ACC GAG CGC GGA AAA 240
 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
 45 50 55 60
 CAG GCA CAG GCA GAT GCT GAC CTG GCC GCA GGG GGT GTG GCA ACC GCA 288
 Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala
 65 70 75
 TTT TCA GGG GCA TTC GGC TAT CCG ATA ACC GAA AAA GAC TCT CCG GAG 336
 Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu
 80 85 90
 CTG TAT AAA CTG CTG ACC AAT ATG ATT GAG GAT GCC GGT GAT CTT GCC 384
 Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 95 100 105
 ACC CGC TCC GCC AAA GAA CAT TAC ATG CGC ATC CGG CCG TTT GCG TTT 432
 Thr Arg Ser Ala Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 110 115 120
 TAC GGC ACA GAA ACC TGT AAT ACC AAA GAT CAG AAA AAA CTC TCC ACC 480
 Tyr Gly Thr Glu Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr
 125 130 135 140
 AAC GGA TCT TAC CCG TCA GGT CAT ACG TCT ATC GGC TGG GCA ACC GCA 528

49 50
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 145 150 155
 CTG GTG CTG GCG GAA GTG AAC CCG GCA AAT CAG GAT GCG ATT CTG GAA 576
 Leu Val Leu Ala Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu
 160 165 170
 CGG GGT TAT CAG CTC GGA CAG AGC CGG GTG ATT TGC GGC TAT CAC TGG 624
 Arg Gly Tyr Gln Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 175 180 185
 CAG AGT GAT GTG GAT GCC GCG CGG ATT GTC GGT TCA GCC GCT GTC GCG 672
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala
 190 195 200
 ACA TTA CAT TCC GAT CCG GCA TTT CAG GCG CAG TTA GCG AAA GCC AAA 720
 Thr Leu His Ser Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys
 205 210 215 220
 CAG GAA TTT GCA CAA AAA TCA CAG AAA TAA 750
 Gln Glu Phe Ala Gln Lys Ser Gln Lys
 225 229

【0183】配列番号3の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 249 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

*(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

20 (A)生物名: モルガネラ・モルガニ (Morganella morganii)

* (B)株名: NCIMB 10466

(xi) 配列: SEQ ID NO: 3:

Met Lys Lys Asn Ile Ile Ala Gly Cys
 Leu Phe Ser Leu Phe Ser Leu
 -20 -15
 -10 -5
 Ser Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly
 Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 1 5
 10
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Glu Gln
 Ala Ile Asp Ser Leu Lys Leu
 15 20
 25
 Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser
 Ile Gln Phe Leu Asn Asp Gln
 30 35
 40
 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Met Leu
 Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
 45 50
 55 60
 Gln Ala Gln Ala Asp Ala Asp Leu Ala
 Ala Gly Gly Val Ala Thr Ala
 65
 70 75
 Phe Ser Gly Ala Phe Gly Tyr Pro Ile
 Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu
 80 85

51

52

90

Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Thr	Asn	Met	Ile
Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala		
		95					100	
			105					
Thr	Arg	Ser	Ala	Lys	Glu	His	Tyr	Met
Arg	Ile	Arg	Pro	Phe	Ala	Phe		
	110					115		
		120						
Tyr	Gly	Thr	Glu	Thr	Cys	Asn	Thr	Lys
Asp	Gln	Lys	Lys	Leu	Ser	Thr		
125					130			
	135					140		
Asn	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ser	Gly	His	Thr
Ser	Ile	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala		
				145				
150					155			
Leu	Val	Leu	Ala	Glu	Val	Asn	Pro	Ala
Asn	Gln	Asp	Ala	Ile	Leu	Glu		
			160					165
			170					
Arg	Gly	Tyr	Gln	Leu	Gly	Gln	Ser	Arg
Val	Ile	Cys	Gly	Tyr	His	Trp		
		175					180	
		185						
Gln	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Ile
Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ala		
	190					195		
		200						
Thr	Leu	His	Ser	Asp	Pro	Ala	Phe	Gln
Ala	Gln	Leu	Ala	Lys	Ala	Lys		
205					210			
	215					220		
Gln	Glu	Phe	Ala	Gln	Lys	Ser	Gln	Lys
				225				229

【0184】配列番号4の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 229 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

*(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: モルガネラ・モルガニ (Morganella morganii)

*40 (B) 株名: NCIMB 10466

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

Ala	Ile	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Asp	Leu	Tyr	Tyr
1				5				10					15		
Leu	Lys	Asn	Glu	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Lys	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro
		20					25					30			
Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln	Ala	Met	Tyr	Glu
		35				40					45				
Lys	Gly	Arg	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Glu	Arg	Gly	Lys	Gln	Ala	Gln	Ala
	50					55				60					
Asp	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	Phe	Ser	Gly	Ala

53 54
 65 70 75 80
 Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ser Pro Glu Leu Tyr Lys Leu
 85 90 95
 Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala
 100 105 110
 Lys Glu His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Gly Thr Glu
 115 120 125
 Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Lys Lys Leu Ser Thr Asn Gly Ser Tyr
 130 135 140
 Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala
 145 150 155 160
 Glu Val Asn Pro Ala Asn Gln Asp Ala Ile Leu Glu Arg Gly Tyr Gln
 165 170 175
 Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val
 180 185 190
 Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Ala Val Ala Thr Leu His Ser
 195 200 205
 Asp Pro Ala Phe Gln Ala Gln Leu Ala Lys Ala Lys Gln Glu Phe Ala
 210 215 220
 Gln Lys Ser Gln Lys
 225 229

【0185】配列番号5の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 15 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

*(v) フラグメント型: N末端フラグメント

(vi) 起源:

(A) 生物名: エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae)

(B) 株名: JCM 1650

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu
 1 5 10 15

【0186】配列番号6の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 750 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源:

(A) 生物名: エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae)

※(B)株名: JCM 1650

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..747

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: sig_peptide

(B) 存在位置: 1..54

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: mat_peptide

※40 (B) 存在位置: 55..747

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

ATG AAA AAA CGT GTT CTG GCA GTT TGT TTT GCC GCA TTG TTC TCT TCT 48
 Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Val Cys Phe Ala Ala Leu Phe Ser Ser
 -18 -15 -10 -5
 CAG GCC CTG GCG CTG GTC GCT ACC GGC AAC GAC ACT ACC ACG AAA CCG 96
 Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro
 1 5 10
 GAT CTC TAC TAC CTC AAG AAC AGT GAA GCC ATT AAC AGC CTG GCG CTG 144
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu
 15 20 25 30

55	56	
TTG CCG CCA CCA CCG GCG GTG GGC TCC ATT GCG TTT CTC AAC GAT CAG	192	
Leu Pro Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln		
35 40 45		
GCC ATG TAT GAA CAG GGG CGC CTG CTG CGC AAC ACC GAA CGC GGT AAG	240	
Ala Met Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys		
50 55 60		
CTG GCG GCG GAA GAT GCA AAC CTG AGC AGT GGC GGG GTG GCG AAT GCT	288	
Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala		
65 70 75		
TTC TCC GGC GCG TTT GGT AGC CCG ATC ACC GAA AAA GAC GCC CCG GCG	336	
Phe Ser Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala		
80 85 90		
CTG CAT AAA TTA CTG ACC AAT ATG ATT GAG GAC GCC GGG GAT CTG GCG	384	
Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala		
95 100 105 110		
ACC CGC AGC GCG AAA GAT CAC TAT ATG CGC ATT CGT CCG TTC GCG TTT	432	
Thr Arg Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe		
115 120 125		
TAT GGG GTC TCT ACC TGT AAT ACC ACC GAG CAG GAC AAA CTG TCC AAA	480	
Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys		
130 135 140		
AAT GGC TCT TAT CCG TCC GGG CAT ACC TCT ATC GGC TGG GCT ACT GCG	528	
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala		
145 150 155		
CTG GTG CTG GCA GAG ATC AAC CCT CAG CGC CAG AAC GAG ATC CTG AAA	576	
Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys		
160 165 170		
CGC GGT TAT GAG CTG GGC CAG AGC CGG GTG ATT TGC GGC TAC CAC TGG	624	
Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp		
175 180 185 190		
CAG AGT GAT GTG GAT GCC GCG CGG GTA GTG GGA TCT GCC GTT GTG GCG	672	
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala		
195 200 205		
ACC CTG CAT ACC AAC CCG GCG TTC CAG CAG CAG TTG CAG AAA GCG AAG	720	
Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys		
210 215 220		
GCC GAA TTC GCC CAG CAT CAG AAG AAA TAA	750	
Ala Glu Phe Ala Gln His Gln Lys Lys		
225 230		

【0187】配列番号7の配列の情報:

40*(ii) 配列の種類: タンパク質

(i) 配列の性質:

(vi) 起源:

(A) 配列の長さ: 249 amino acids

(A) 生物名: エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae)

(B) 配列の型: アミノ酸

* (B) 株名: JCM 1650

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: SEQ ID NO:7:

Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Val Cys Phe Ala Ala Leu Phe Ser Ser
 -18 -15 -10 -5
 Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro
 1 5 10
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu

57 58

15 20 25 30

Leu Pro Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln

35 40 45

Ala Met Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys

50 55 60

Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala

65 70 75

Phe Ser Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala

80 85 90

Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala

95 100 105 110

Thr Arg Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe

115 120 125

Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys

130 135 140

Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala

145 150 155

Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys

160 165 170

Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp

175 180 185 190

Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala

195 200 205

Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys

210 215 220

Ala Glu Phe Ala Gln His Gln Lys Lys

225 230

【0188】配列番号8の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 231 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

*(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

30 (A) 生物名: エシェリヒア・ブラッタエ (Escherichia blattae)

* (B) 株名: JCM 1650

(xi) 配列: SEQ ID NO:8:

Leu Ala Leu Val Ala Thr Gly Asn Asp Thr Thr Thr Lys Pro Asp Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Glu Ala Ile Asn Ser Leu Ala Leu Leu Pro

20 25 30

Pro Pro Pro Ala Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln Ala Met

35 40 45

Tyr Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys Leu Ala

50 55 60

Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala Phe Ser

65 70 75 80

Gly Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Ala Leu His

85 90 95

Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg

100 105 110

Ser Ala Lys Asp His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Gly

115 120 125

Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys Asn Gly

59
130 135 140
Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val
145 150 155 160
Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys Arg Gly
165 170 175
Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser
180 185 190
Asp Val Asp Ala Ala Arg Val Val Gly Ser Ala Val Val Ala Thr Leu
195 200 205
His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys Ala Glu
210 215 220
Phe Ala Gln His Gln Lys Lys
225 230

【0189】配列番号9の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:9:

CCTCGAGGTC GACGGTATCG 20

【0190】配列番号10の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:10:

ATTCGCCACA TCGCCACTGC T 21

【0191】配列番号11の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 22 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:11:

TAGCCCAGCC GGTAGAGGTA TG 22

【0192】配列番号12の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 23 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:12:

TGCATCTGCC TGCCTGCT TAC 23

【0193】配列番号13の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 bases

20 (B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:13:

AACGCGCCGT AGAAAGCATT 20

【0194】配列番号14の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

30 (B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:14:

GTCCTGGTCT TTGGTATTAC A 21

【0195】配列番号15の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 26 bases

40 (B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:15:

CACATCGCCA GCGCCAGGT CTGCAT 26

【0196】配列番号16の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

50 (B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 (iv) アンチセンス:
 (xi) 配列: SEQ ID NO:16:
 GCATATAGTG TTCTTCGCG C 21

【0197】配列番号17の配列の情報:

(i) 配列の性質:
 (A) 配列の長さ: 22 bases
 (B) 配列の型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 (iv) アンチセンス:
 (xi) 配列: SEQ ID NO:17:
 ATTACAGGTT TCGACCCCAT AA 22

【0198】配列番号18の配列の情報:

(i) 配列の性質:
 (A) 配列の長さ: 25 bases
 (B) 配列の型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 (iv) アンチセンス:
 (xi) 配列: SEQ ID NO:18:
 TGATGTCAGTT CCGGGCTGTC TTT
 TT 25

【0199】配列番号19の配列の情報:

(i) 配列の性質:
 (A) 配列の長さ: 25 bases

(xi) 配列: SEQ ID NO:21:

ATG AAA AAA CTA TTA GCA GTA TTC TGC GCA GGG GCT TTT GTT TCA ACC	48
Met Lys Lys Leu Leu Ala Val Phe Cys Ala Gly Ala Phe Val Ser Thr	
1 5 10 15	
AGT GTA TTT GCG GCG ATC CCT CCC GGC AAT GAT GTG ACA ACT AAA CCC	96
Ser Val Phe Ala Ala Ile Pro Pro Gly Asn Asp Val Thr Thr Lys Pro	
20 25 30	
GAT CTT TAT TAT TTA AAA AAC TCA CAG GCT ATT GAT AGT TTA GCG TTA	144
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu	
35 40 45	
TTG CCG CCA CCA CCT GAA GTG GGC AGT ATC TTA TTT TTA AAC GAC CAA	192
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Leu Phe Leu Asn Asp Gln	
50 55 60	
GCG ATG TAT GAA AAA GGC CGT TTA TTG CGA AAT ACT GAG CGT GGA GAA	240
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Glu	
65 70 75 80	
CAA GCC GCT AAG GAT GCT GAT CTG GCT GCG GGC GGT GTT GCG AAC GCA	288
Gln Ala Ala Lys Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala	
85 90 95	
TTT TCT GAA GCT TTT GGT TAT CCC ATT ACC GAA AAG GAT GCG CCT GAA	336

* (B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 (iv) アンチセンス:
 (xi) 配列: SEQ ID NO:19:
 CTGGATCCTG TGGCTATCAT CACCT 25

【0200】配列番号20の配列の情報:

(i) 配列の性質:
 10 (A) 配列の長さ: 25 bases
 (B) 配列の型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 (iv) アンチセンス:
 (xi) 配列: SEQ ID NO:20:
 CTGGATCCGA CGCGATTTA CCATA 25

【0201】配列番号21の配列の情報:

(i) 配列の性質:
 20 (A) 配列の長さ: 747 bases
 (B) 配列の型: 核酸
 (C) 鎖の数: 二本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: Genomic DNA
 (vi) 起源:
 (A) 生物名: プロピデンシア・スチュアルティ
 (B) 株名: ATCC 29851
 (ix) 配列の特徴:
 (A) 特徴を表す記号: CDS
 *30 (B) 存在位置: 1..744

63		64
Phe Ser Glu Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Glu		
100	105	110
ATT CAT AAA TTG CTG ACG AAT ATG ATT GAA GAT GCG GGG GAT TTA CCA		384
Ile His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala		
115	120	125
ACT CGC TCA GCC AAA GAG AAA TAC ATG CGC ATT CGT CCA TTT GCG TTC		432
Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe		
130	135	140
TAC GGT GTT GCT ACC TGT AAC ACG AAA GAT CAG GAC AAA TTA TCT AAG		480
Tyr Gly Val Ala Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Asp Lys Leu Ser Lys		
145	150	155
AAT GGC TCT TAT CCT TCT GGA CAC ACC GCA ATT GGC TGG GCA TCT GCA		528
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ala Ile Gly Trp Ala Ser Ala		
165	170	175
CTC GTA TTG TCA GAA ATT AAC CCA GAA AAC CAA GAT AAA ATT TTA AAA		576
Leu Val Leu Ser Glu Ile Asn Pro Glu Asn Gln Asp Lys Ile Leu Lys		
180	185	190
CGT GGT TAT GAA CTT GGC CAA AGC CGA GTC ATC TGT GGT TAC CAT TGG		624
Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp		
195	200	205
CAA AGT GAT GTT GAT GCA GCT CGT ATC GTT GCA TCG GGT GCG GTA GCA		672
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Ala Ser Gly Ala Val Ala		
210	215	220
ACT TTA CAC TCC AAC CCT GAA TTC CAA AAA CAG TTA CAA AAA GCC AAA		720
Thr Leu His Ser Asn Pro Glu Phe Gln Lys Gln Leu Gln Lys Ala Lys		
225	230	235
GAC GAA TTT GCT AAA CTG AAA AAA TAG		747
Asp Glu Phe Ala Lys Leu Lys Lys		
245		

【0202】配列番号22の配列の情報:

30*(ii) 配列の種類: タンパク質

(i) 配列の性質:

(vi) 起源:

(A) 配列の長さ: 248 amino acids

(A) 生物名: プロビデンシア・スチュアルティ

(B) 配列の型: アミノ酸

(B) 株名: ATCC 29851

(D) トポロジー: 直鎖状

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:22:

Met Lys Lys Leu Leu Ala Val Phe Cys Ala Gly Ala Phe Val Ser Thr		
1	5	10
Ser Val Phe Ala Ala Ile Pro Pro Gly Asn Asp Val Thr Thr Lys Pro		
20	25	30
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ser Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu		
35	40	45
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Leu Phe Leu Asn Asp Gln		
50	55	60
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Glu		
65	70	75
Gln Ala Ala Lys Asp Ala Asp Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala		
85	90	95
Phe Ser Glu Ala Phe Gly Tyr Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Glu		
100	105	110
Ile His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala		

65
115 120 125
Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
130 135 140
Tyr Gly Val Ala Thr Cys Asn Thr Lys Asp Gln Asp Lys Leu Ser Lys
145 150 155 160
Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ala Ile Gly Trp Ala Ser Ala
165 170 175
Leu Val Leu Ser Glu Ile Asn Pro Glu Asn Gln Asp Lys Ile Leu Lys
180 185 190
Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
195 200 205
Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Ala Ser Gly Ala Val Ala
210 215 220
Thr Leu His Ser Asn Pro Glu Phe Gln Lys Gln Leu Gln Lys Ala Lys
225 230 235 240
Asp Glu Phe Ala Lys Leu Lys Lys
245

【0203】配列番号23の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 747 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

*(vi) 起源:

(A) 生物名: エンテロバクター・アエロゲネス

20 (B) 株名: IF0 12010

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..744

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:23:

ATG AAA AAG CGC GTT CTC GCC CTC TGC CTC GCC AGC CTG TTT TCC GTT 48
Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val
1 5 10 15
AAC GCT TTC GCG CTG GTC CCT GCC GGC AAT GAT GCA ACC ACC AAA CCG 96
Asn Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
20 25 30
GAT CTC TAT TAT CTG AAA AAT GCA CAG GCC ATC GAT AGT CTG GCG CTG 144
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu
35 40 45
TTG CCG CCG CCG CCG GAA GTT GGC AGC ATC GCA TTT TTA AAC GAT CAG 192
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln
50 55 60
GCG ATG TAT GAG AAA GGA CGG CTG TTG CGC AAT ACC GAA CGT GGC AAG 240
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
65 70 75 80
CTG GCG GCT GAA GAT GCT AAC CTG AGC GCC GGC GGC GTC GCG AAT GCC 288
Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala
85 90 95
TTC TCC AGC GCT TTT GGT TCG CCC ATC ACC GAA AAA GAC GCG CCG CAG 336
Phe Ser Ser Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Gln
100 105 110
TTA CAT AAG CTG CTG ACA AAT ATG ATT GAG GAT GCC GGC GAT CTG GCC 384
Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
115 120 125
ACC CGC AGC GCG AAA GAG AAA TAT ATG CGC ATT CGC CCG TTT GCG TTC 432

67 68
 Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 130 135 140
 TAC GGC GTT TCA ACC TGT AAC ACT ACC GAG CAG GAC AAG CTG TCG AAA 480
 Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 145 150 155 160
 AAC GGA TCT TAC CCT TCC GGC CAT ACC TCT ATC GGT TGG GCA ACC GCG 528
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala
 165 170 175
 CTG GTA CTG GCG GAG ATC AAT CCG CAG CGG CAA AAC GAA ATT CTC AAA 576
 Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys
 180 185 190
 CGC GGC TAT GAA TTG GGC GAA AGC CGG GTT ATC TGC GGC TAT CAT TGG 624
 Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp
 195 200 205
 CAG AGC GAT GTC GAT GCG GCG CGG ATA GTC GGC TCG GCG GTG GTG GCG 672
 Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala
 210 215 220
 ACC CTG CAT ACC AAC CCG GCC TTC CAA CAG CAG TTG CAG AAA GCA AAG 720
 Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
 225 230 235 240
 GAT GAA TTC GCC AAA ACG CAG AAG TAA 747
 Asp Glu Phe Ala Lys Thr Gln Lys
 245

【0204】配列番号24の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 248 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

*(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

(A) 生物名: エンテロバクター・アエロゲネス

(B) 株名: IFO 12010

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:24:

Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro
 20 25 30
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu
 35 40 45
 Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln
 50 55 60
 Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Asn Thr Glu Arg Gly Lys
 65 70 75 80
 Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala
 85 90 95
 Phe Ser Ser Ala Phe Gly Ser Pro Ile Thr Glu Lys Asp Ala Pro Gln
 100 105 110
 Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala
 115 120 125
 Thr Arg Ser Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe
 130 135 140
 Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys
 145 150 155 160
 Asn Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Thr Ser Ile Gly Trp Ala Thr Ala

69 165 170 175 70

Leu Val Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln Arg Gln Asn Glu Ile Leu Lys

180 185 190

Arg Gly Tyr Glu Leu Gly Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp

195 200 205

Gln Ser Asp Val Asp Ala Ala Arg Ile Val Gly Ser Ala Val Val Ala

210 215 220

Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys

225 230 235 240

Asp Glu Phe Ala Lys Thr Gln Lys

245

【0205】配列番号25の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 747 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

*(vi) 起源:

(A) 生物名: クレブジエラ・プランティコラ

(B) 株名: IFO 14939

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..744

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:25:

ATG AAA AAG CGT GTA CTC GCC CTT TGC CTT GCC AGC CTC TTT TCA GTT	48
Met Lys Lys Arg Val Leu Ala Leu Cys Leu Ala Ser Leu Phe Ser Val	
1 5 10 15	
AGC GCC TTT GCG CTG GTT CCC GCC GGC AAT GAT GCC ACC ACC AAG CCC	96
Ser Ala Phe Ala Leu Val Pro Ala Gly Asn Asp Ala Thr Thr Lys Pro	
20 25 30	
GAT CTC TAC TAT CTG AAA AAT GCC CAG GCC ATT GAC AGC CTG GCG CTG	144
Asp Leu Tyr Tyr Leu Lys Asn Ala Gln Ala Ile Asp Ser Leu Ala Leu	
35 40 45	
TTG CCA CCG CCG CCG GAA GTG GGC AGC ATT GCG TTT TTA AAC GAT CAG	192
Leu Pro Pro Pro Pro Glu Val Gly Ser Ile Ala Phe Leu Asn Asp Gln	
50 55 60	
GCG ATG TAT GAG AAA GGC CGT CTG CTG CGC GCC ACC GCC CGC GGC AAG	240
Ala Met Tyr Glu Lys Gly Arg Leu Leu Arg Ala Thr Ala Arg Gly Lys	
65 70 75 80	
TTG GCG GCA GAA GAT GCC AAC CTG AGC GCG GGT GGC GTG GCC AAC GCC	288
Leu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala	
85 90 95	
TTC TCC GCA GCA TTC GGC TCC CCG ATC AGC GAA AAA GAC GCC CCG GCG	336
Phe Ser Ala Ala Phe Gly Ser Pro Ile Ser Glu Lys Asp Ala Pro Ala	
100 105 110	
CTG CAC AAA CTG CTC ACC AAC ATG ATT GAA GAC GCG GGC GAT CTG GCG	384
Leu His Lys Leu Leu Thr Asn Met Ile Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala	
115 120 125	
ACC CGA GGC GCG AAA GAG AAG TAT ATG CGT ATT CGT CCG TTT GCC TTC	432
Thr Arg Gly Ala Lys Glu Lys Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe	
130 135 140	
TAC GGC GTG TCC ACC TGC AAT ACC ACC GAA CAG GAT AAG CTG TCG AAA	480
Tyr Gly Val Ser Thr Cys Asn Thr Thr Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys	
145 150 155 160	
AAC GGC TCC TAC CCT TCC GGA CAC ACC TCT ATC GGC TGG GCG ACC GCC	528

71																			72
Asn	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ser	Gly	His	Thr	Ser	Ile	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala				
				165					170						175				
CTG	GTG	CTG	GCC	GAA	ATC	AAC	CCG	CAG	CGC	CAG	AAT	GAG	ATT	CTC	AAG			576	
Leu	Val	Leu	Ala	Glu	Ile	Asn	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys				
			180					185					190						
CGC	GGC	TAT	GAG	CTC	GGT	GAA	AGT	CGG	GTG	ATC	TGC	GGT	TAC	CAC	TGG			624	
Arg	Gly	Tyr	Glu	Leu	Gly	Glu	Ser	Arg	Val	Ile	Cys	Gly	Tyr	His	Trp				
		195					200				205								
CAG	AGC	GAT	GTT	GAC	GCC	GCG	CGG	ATT	GTC	GGC	TCG	GCG	GTG	GTT	GCA			672	
Gln	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Ala				
	210					215				220									
ACC	CTG	CAT	ACC	AAT	CCG	GCC	TTC	CAG	CAG	CAG	CTG	CAA	AAA	GCC	AAA			720	
Thr	Leu	His	Thr	Asn	Pro	Ala	Phe	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala	Lys				
225				230					235				240						
GAC	GAG	TTT	GCG	AAA	CAG	CAG	AAA	TAG										747	
Asp	Glu	Phe	Ala	Lys	Gln	Gln	Lys												
				245															

【0206】配列番号26の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 248 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

*(ii) 配列の種類: タンパク質

(vi) 起源:

20 (A) 生物名: クレブジエラ・ブランティコラ

(B) 株名: IFO 14939

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:26:

Met	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Val				
1				5				10					15						
Ser	Ala	Phe	Ala	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Asn	Asp	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro				
		20				25					30								
Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu				
	35					40					45								
Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Phe	Leu	Asn	Asp	Gln				
	50				55					60									
Ala	Met	Tyr	Glu	Lys	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Ala	Thr	Ala	Arg	Gly	Lys				
	65			70				75					80						
Leu	Ala	Ala	Glu	Asp	Ala	Asn	Leu	Ser	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Asn	Ala				
			85					90					95						
Phe	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ser	Pro	Ile	Ser	Glu	Lys	Asp	Ala	Pro	Ala				
	100					105						110							
Leu	His	Lys	Leu	Leu	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala				
	115				120					125									
Thr	Arg	Gly	Ala	Lys	Glu	Lys	Tyr	Met	Arg	Ile	Arg	Pro	Phe	Ala	Phe				
	130				135					140									
Tyr	Gly	Val	Ser	Thr	Cys	Asn	Thr	Thr	Glu	Gln	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys				
	145			150				155					160						
Asn	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ser	Gly	His	Thr	Ser	Ile	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala				
		165						170					175						
Leu	Val	Leu	Ala	Glu	Ile	Asn	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys				
		180						185					190						
Arg	Gly	Tyr	Glu	Leu	Gly	Glu	Ser	Arg	Val	Ile	Cys	Gly	Tyr	His	Trp				
	195					200						205							
Gln	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Ala				

73
210 215 220
Thr Leu His Thr Asn Pro Ala Phe Gln Gln Gln Leu Gln Lys Ala Lys
225 230 235 240
Asp Glu Phe Ala Lys Gln Gln Lys
245

【0207】配列番号27の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 735 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

*(vi) 起源:

(A) 生物名: セラチア・フィカリア

(B) 株名: IAM 13540

(ix) 配列の特徴:

10 (A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..732

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:27:

ATG AAA AAA ATA TTA TTA GCC ACA TTA AGC TGC GCC GCG TTG ACG CAG	48
Met Lys Lys Ile Leu Leu Ala Thr Leu Ser Cys Ala Ala Leu Thr Gln	
1 5 10 15	
TTT TCC TTT GCC GCC AAA GAT GTC ACT ACC CAC CCT GAG GTT TAT TTT	96
Phe Ser Phe Ala Ala Lys Asp Val Thr Thr His Pro Glu Val Tyr Phe	
20 25 30	
CTG CAA GAA TCA CAG TCC ATC GAC AGC CTG GCA CTA TTG CCG CCG CCG	144
Leu Gln Glu Ser Gln Ser Ile Asp Ser Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro	
35 40 45	
CCG GCG ATG GAC AGC ATT GAT TTC CTG AAT GAC AAA GCG CAA TAC GAC	192
Pro Ala Met Asp Ser Ile Asp Phe Leu Asn Asp Lys Ala Gln Tyr Asp	
50 55 60	
GCC GGG AAA ATA GTG CGC AAT ACT CCG CGT GGC AAG CAG GCT TAT GAT	240
Ala Gly Lys Ile Val Arg Asn Thr Pro Arg Gly Lys Gln Ala Tyr Asp	
65 70 75 80	
GAC GCC CAC GTT GCC GGG GAC GGC GTT GCC GCC GCA TTT TCC AAC GCC	288
Asp Ala His Val Ala Gly Asp Gly Val Ala Ala Ala Phe Ser Asn Ala	
85 90 95	
TTC GGC CTA GAA ATA GCC CAA CGG AAA ACG CCG GAG CTG TTT AAG CTG	336
Phe Gly Leu Glu Ile Ala Gln Arg Lys Thr Pro Glu Leu Phe Lys Leu	
100 105 110	
GTG ATG AAA ATG CGT GAA GAC GCC GGC GAT TTG GCG ACC CGC AGC GCC	384
Val Met Lys Met Arg Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala	
115 120 125	
AAA AAT CAC TAT ATG CGC ATT CGC CCC TTT GCG TTT TAT AAC GAA GCG	432
Lys Asn His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Asn Glu Ala	
130 135 140	
ACC TGC CGA CCG GAC GAA GAA AGC ACC CTG TCG AAG AAC GGT TCT TAC	480
Thr Cys Arg Pro Asp Glu Glu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Gly Ser Tyr	
145 150 155 160	
CCT TCC GGC CAT ACC ACC ATC GGC TGG GCG ACC GCG CTG GTG CTG GCT	528
Pro Ser Gly His Thr Thr Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala	
165 170 175	
GAA ATC AAC CCC GCC AGG CAG GGT GAA ATC CTG CAG GCG GGC TAT GAT	576
Glu Ile Asn Pro Ala Arg Gln Gly Glu Ile Leu Gln Arg Gly Tyr Asp	
180 185 190	
ATG GGC CAA AGC CGG GTT ATC TGC GGT TAT CAC TGG CAA AGC GAC GTG	624

75 76
 Met Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val
 195 200 205
 ACT GCG GCG CGC ATG GCG GCG TCG GCC ATG GTG GCG CGT TTG CAT GCC 672
 Thr Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Ala Met Val Ala Arg Leu His Ala
 210 215 220
 GAA CCC ACC TTC GCC GCC CAG CTG CAA AAG GCC AAA GAC GAA TTC AAC 720
 Glu Pro Thr Phe Ala Ala Gln Leu Gln Lys Ala Lys Asp Glu Phe Asn
 225 230 235 240
 GGC CTG AAA AAG TAA 735
 Gly Leu Lys Lys

【0208】配列番号28の配列の情報:

*(ii) 配列の種類: タンパク質

(i) 配列の性質:

(vi) 起源:

(A) 配列の長さ: 244 amino acids

(A)生物名: セラチア・フィカリア

(B) 配列の型: アミノ酸

(B)株名: IAM 13540

(D) トポロジー: 直鎖状

*

(xi) 配列: SEQ ID NO:28:

Met Lys Lys Ile Leu Leu Ala Thr Leu Ser Cys Ala Ala Leu Thr Gln
 1 5 10 15
 Phe Ser Phe Ala Ala Lys Asp Val Thr Thr His Pro Glu Val Tyr Phe
 20 25 30
 Leu Gln Glu Ser Gln Ser Ile Asp Ser Leu Ala Leu Leu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Pro Ala Met Asp Ser Ile Asp Phe Leu Asn Asp Lys Ala Gln Tyr Asp
 50 55 60
 Ala Gly Lys Ile Val Arg Asn Thr Pro Arg Gly Lys Gln Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Asp Ala His Val Ala Gly Asp Gly Val Ala Ala Ala Phe Ser Asn Ala
 85 90 95
 Phe Gly Leu Glu Ile Ala Gln Arg Lys Thr Pro Glu Leu Phe Lys Leu
 100 105 110
 Val Met Lys Met Arg Glu Asp Ala Gly Asp Leu Ala Thr Arg Ser Ala
 115 120 125
 Lys Asn His Tyr Met Arg Ile Arg Pro Phe Ala Phe Tyr Asn Glu Ala
 130 135 140
 Thr Cys Arg Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Gly Ser Tyr
 145 150 155 160
 Pro Ser Gly His Thr Thr Ile Gly Trp Ala Thr Ala Leu Val Leu Ala
 165 170 175
 Glu Ile Asn Pro Ala Arg Gln Gly Glu Ile Leu Gln Arg Gly Tyr Asp
 180 185 190
 Met Gly Gln Ser Arg Val Ile Cys Gly Tyr His Trp Gln Ser Asp Val
 195 200 205
 Thr Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Ala Met Val Ala Arg Leu His Ala
 210 215 220
 Glu Pro Thr Phe Ala Ala Gln Leu Gln Lys Ala Lys Asp Glu Phe Asn
 225 230 235 240
 Gly Leu Lys Lys

【0209】配列番号29の配列の情報:

(B) 配列の型: 核酸

(i) 配列の性質:

(C) 鎖の数: 一本鎖

(A) 配列の長さ: 21 bases

50 (D) トポロジー: 直鎖状

77

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:29:

CCCGGCGTCA CCAATCATAT T 21

【0210】配列番号30の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 21 bases

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iv) アンチセンス:

(xi) 配列: SEQ ID NO:30:

GCCGGTAGAG GCATGCCCGG A 21

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、モルガネラ・モルガニ由来の酵素を用いた反応において反応pHと5'-イノシン酸生成量との関係を示す図である。

【図2】 図2は、エシェリヒア・ブラッカエ由来の酵素を用いた反応において反応pHと5'-イノシン酸生成量との関係を示す図である。

【図3】 図3は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むモルガネラ・モルガニの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

【図4】 図4は、モルガネラ・モルガニ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

【図5】 図5は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むエシェリヒア・ブラッカエの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

【図6】 図6は、エシェリヒア・ブラッカエ由来の酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における

78

5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

【図7】 図7は、エシェリヒア・ブラッカエ由来の野生型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株及び変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す図である。

【図8】 図8は、エシェリヒア・ブラッカエ由来の新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株を用いた反応における5'-イノシン酸の生産量を示す線図である。

10 【図9】 図9は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むエンテロバクター・アエロゲネスの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

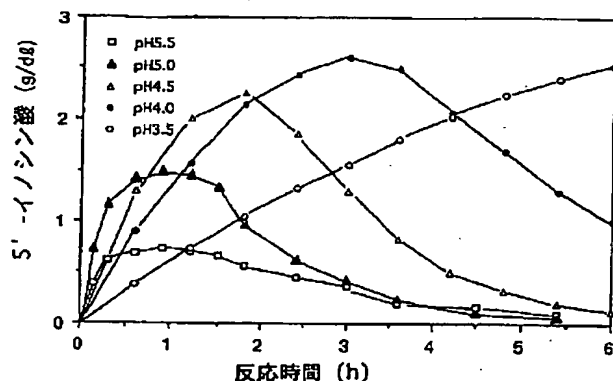
【図10】 図10は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むクレブシエラ・ブランティコラの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

【図11】 図11は、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子を含むセラチア・フィカリアの染色体DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

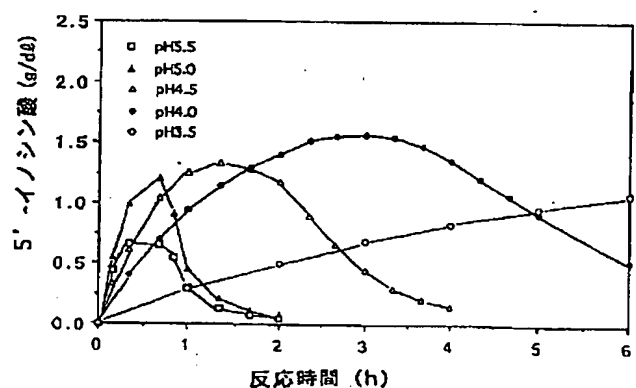
【図12】 図12は、モルガネラ・モルガニ、エシェリヒア・ブラッカエ、プロビデンシア・スチュアルティ、エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・ブランティコラ及びセラチア・フィカリアの酸性フォスファターゼ遺伝子の塩基配列より予想される蛋白質のアミノ酸配列をアミノ酸の一文字表記で示した図である。これらのアミノ酸配列は、各々配列表配列番号4、8、22、24、26及び28に3文字表記で示されている。図中ですべてのアミノ酸配列において共通のアミノ酸残基を配列の下に*で示した。

30 【図13】 図13はエシェリヒア・ブラッカエ由来の新規変異型酸性フォスファターゼ遺伝子保持株より調製した無細胞抽出液中の酸性フォスファターゼ活性の温度安定性を示す線図である。

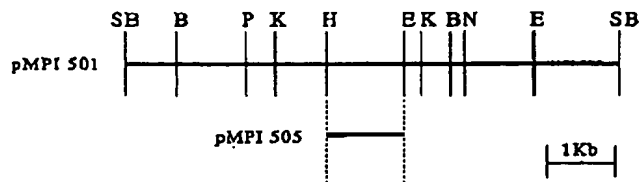
【図1】



【図2】

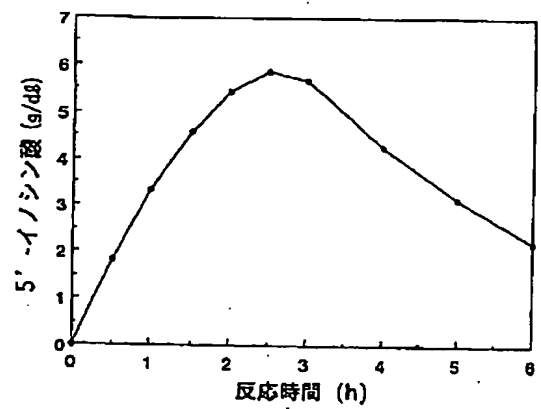


【図3】

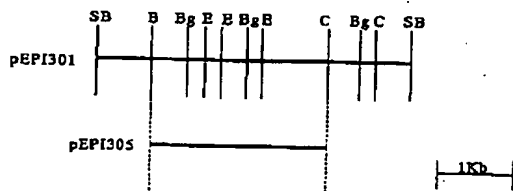


SB: *Sau*3A1 / *Bam*HI junction B: *Bam*HI E: *Eco*RI K: *Kpn*I
H: *Hind*III N: *Nco*I P: *Pst*I

【図4】

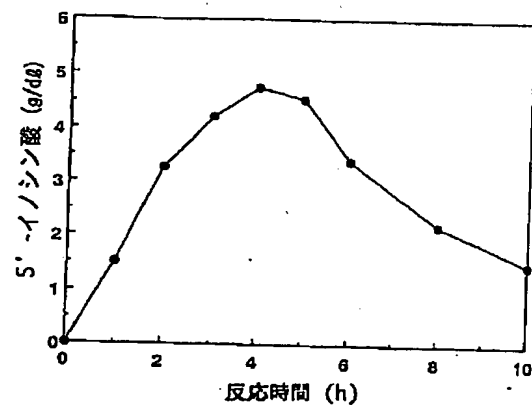


【図5】

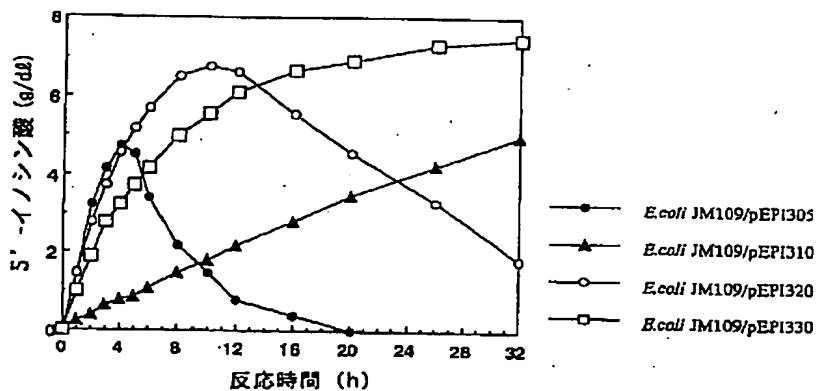


SB: *Sau*3A1 / *Bam*HI junction B: *Bam*HI Bg: *Bgl*II C: *Cla*I E: *Eco*RI

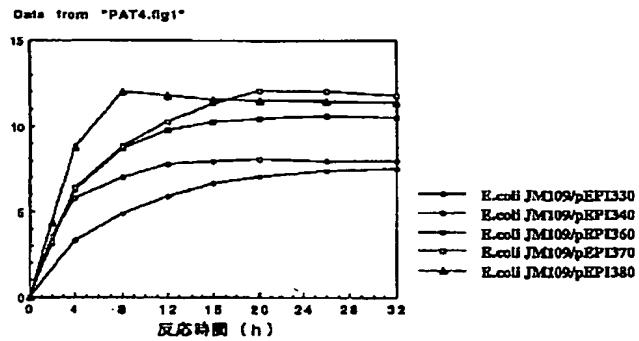
【図6】



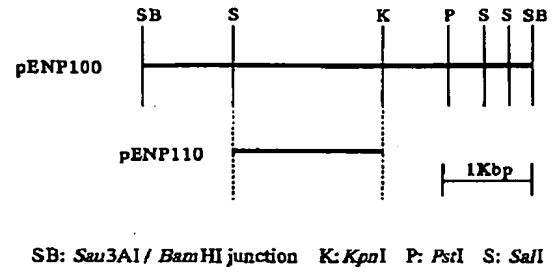
【図7】



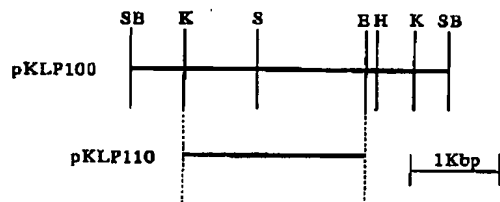
【図8】



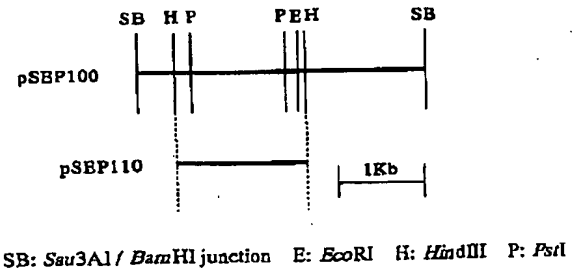
【図9】



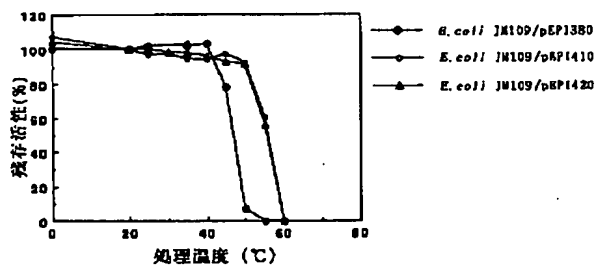
【図10】



【図11】



【図13】



【図12】

E. aerogenes	1:MKKRVLALCLASLFSYNALFALVPAGNDATTKPDLYYLKNAQAIDSLALLP	50
E. blattae	1:MKKRVLAYCFALFSSQALALVATCNDTTTKPDLYYLKNSAIDSLALLP	50
K. planticola	1:MKKRVLALCLASLFSVSALFALVPAGNDATTKPDLYYLKNAQAIDSLALLP	50
M. morgani	1:MKKNI IAGCLFSLFSLALAAIPAGNDATTKPDLYYLKNEQAIDSLKLLP	50
P. stuartii	1:MKKLLAYFCAGAFVSTSVFAAIPPGNDVTTKPDLYYLKNSQAIDSLALLP	50
S. ficaria	1:MKK-ILLA-TLSCAALTQFS--FAAKDVTTHPEVYFLQESQSIDSLALLP	46
*** * * * *		
E. aerogenes	51:PPPEVGSIAFLNDQAMYEGRLLRNTERGKLAEDANLSAGGYANAFSSA	100
E. blattae	51:PPPAYGSIAFLNDQAMYEQGRLLRNTERGKLAEDANLSGGVYANAFSGA	100
K. planticola	51:PPPEVGSIAFLNDQAMYEGRLLRNTERGKLAEDANLSAGGYANAFSAA	100
M. morgani	51:PPPEVGSIQFLNDQAMYEGRMLRNTERGKQAQADADLAAGGVATAFSGA	100
P. stuartii	51:PPPEVGSILFLNDQAMYEGRLLRNTERGEQAADADLAAGGYANAFSEA	100
S. ficaria	47:PPPANDSIDFLNKAQYDACKIVRNTPRGKQAYDDAHVAGDGVAAAFSNA	96
*** * * * *		
E. aerogenes	101:FGSPITEKDAPQLHKLLTNMIEDAGDLATRSACEKYMRIRPFAYGVSTC	150
E. blattae	101:FGSPITEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRSACDHYMRIRPFAYGVSTC	150
K. planticola	101:FGSPISEKDAPALHKLLTNMIEDAGDLATRCACEKYMRIRPFAYGVSTC	150
M. morgani	101:FGYPITEBKDSPELYKLLTNMIEDAGDLATRSACEHYMRIRPFAYGVSTC	150
P. stuartii	101:FGYPITEKDAPEIHKLLTNMIEDAGDLATRSACEKYMRIRPFAYGVATC	150
S. ficaria	97:FCLBIAQRKTPELFKLVKMRDAGDLATRSACKHYMRIRPFAYNEATC	146
** * * * *		
E. aerogenes	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAEINPQRQNEILKRGYELGES	200
E. blattae	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAEINPQRQNEILKRGYELGQS	200
K. planticola	151:NTTEQDKLSKNGSYPSGHTSIGWATALVLAEINPQRQNEILKRGYELGES	200
M. morgani	151:NTKDQKKLSTNGSYPSGHTSIGWATALVLAEVNPNQDAILERGYQLGQS	200
P. stuartii	151:NTKDQDKLSKNGSYPSGHTAIGWASALVLSEINPENQDKILKRGYELGQS	200
S. ficaria	147:RPDEESTLSKNGSYPSGHTTIGWATALVLAEINPARQGEILQRGYDMGQS	196
* * * * *		
E. blattae	201:RVICGYHWQSDVDAARVYGSAYVATLHTNPAFQQQLQKAKAEFAQHQQK	249
K. planticola	201:RVICGYHWQSDVDAARIVGSAYVATLHTNPAFQQQLQKAKDEFAKQQK-	248
M. morgani	201:RVICGYHWQSDVDAARIVGSAAVATLHSDPAFQAQLAKAKQSFQKQK	249
E. aerogenes	201:RVICGYHWQSDVDAARIVGSAYVATLHTNPAFQQQLQKAKDEFAKTQK-	248
P. stuartii	201:RVICGYHWQSDVDAARIVASGAVATLHNSNPEFQKQLQKAKDEFA-KLKK	248
S. ficaria	197:RVICGYHWQSDVTAARMAASAMVRLHAEPFFAAQLQKAKDEF-NGLKK	244
***** * * * *		

フロントページの続き

(51)Int.Cl. [°]	識別記号	F I
C 12 R 1:01)		
(C 12 N 15/09	ZNA	
C 12 R 1:185)		
(C 12 N 15/09	ZNA	
C 12 R 1:22)		
(C 12 N 15/09	ZNA	
C 12 R 1:425)		
(C 12 N 1/21		
C 12 R 1:19)		
(C 12 N 9/16		
C 12 R 1:01)		
(C 12 N 9/16		

C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 19/36
C 1 2 R 1:19)